Série A. Dr
Dr d'ordre : 2070

THESE

PRÉSENTÉE

A L'UNIVERSITÉ DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

POUR OBTENIR LE TITRE DE DOCTEUR 3ÈME CYCLE

SPÉCIALITÉ : BIOLOGIE CELLULAIRE

MENTION BIOCHIMIE

PAR

MICHEL GERVAIS

SUJET DE LA THÈSE : STRUCTURE TRIGLOBULAIRE DU FLAVOCYTOCHROME B_2

CARACTÉRISATION DES DOMAINES FLAVODÉSHYDROGÉNASE ET CYTOCHROME SÉPARÉS PAR LA TRYPSINE.

SOUTENUE LE 30 AVRIL 1976 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

MLLE J. YON	PRÉSIDENT
M. C. GHELIS	
M. P. LABBE	EXAMINATEURS
MME F. LABEYRIE	

THESE

PRÉSENTÉE

A L'UNIVERSITÉ DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

POUR OBTENIR LE TITRE DE DOCTEUR 3ÈME CYCLE

SPÉCIALITÉ : BIOLOGIE CELLULAIRE

MENTION BIOCHIMIE

PAR

MICHEL GERVAIS

SUJET DE LA THÈSE : STRUCTURE TRIGLOBULAIRE DU FLAVOCYTOCHROME B_2

CARACTÉRISATION DES DOMAINES FLAVODÉSHYDROGÉNASE ET CYTOCHROME SÉPARÉS PAR LA TRYPSINE.

SOUTENUE LE 30 AVRIL 1976 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

MLLE J. YON	PRÉSIDENT
M. C. GHELIS	
M. P. LABBE	EXAMINATEURS
MME F. LABEYRIE	

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Mme F. LABEYRIE au Centre de Génétique Moléculaire du C.N.R.S. que dirige M. P. SLONIMSKI.

J'ai bénéficié pour l'accomplir d'une bourse de la Fondation pour la Recherche Médicale en 1975.

Que Mme F. LABEYRIE, qui a dirigé cette recherche trouve ici l'expression de toute ma reconnaissance, en particulier pour ses critiques constructives.

Je tiens à remercier M. M. IWATSUBO de sa collaboration pour les cinétiques rapides ainsi que pour ses conseils.

Que soient également remerciés les membres de mon jury :
Mlle J. YON, Mrs. C. GHELIS et P. LABBE qui ont accepté de consacrer du temps pour juger ce travail.

Que tous ceux qui ont collaboré à ce travail trouvent ici leur juste part de gratitude, en particulier Mlle L. NASLIN qui m'a énormément aidé -avec Mme T. IWATSBUBO- dans la préparation de l'enzyme et m'a initié à la technique de l'électrophorèse, Mme Y. RISLER pour sa participation efficace aux études des cinétiques stationnaires, M. B. GUIARD qui m'a invité à collaborer à des expériences immunologiques et Mlle D. LAPOINTE pour la réalisation pratique de cette thèse.

Je n'oublie pas pour autant tous les autres camarades du laboratoire dont j'ai pu apprécier les qualités scientifiques et humaines.

Que soient enfin surtout remerciés mes parents aux sacrifices desquels je dois de pouvoir aujourd'hui écrire ces lignes ainsi que Mlles C. MULET et O. GROUDINSKY pour leur disponibilité constante et leur soutien moral, matériel et intellectuel.

Abréviations

INTRODUCTION p 3

MATERIEL ET METHODES 9

A/ Matériel 10

a) Levure
b) H-flavocytochrome b_2
c) Trypsine
d) Produits divers

B/ Méthodes 13

a) Préparation du L(+)lactate
b) Préparation extemporanée du H-flavocytochrome b_2
c) Mesure des concentrations en H-flavocytochrome b_2
d) Mesures d'activité standard du H-flavocytochrome b_2
e) Conduite des hydrolyses 14
f) Electrophorèses GPA, SDS
g) Traitement des données expérimentales 15
h) Dosage du FMN fixé sur le H-flavocytochrome b_2 17
i) Détermination des coefficients de sédimentation
j) Chromatographie sur colonne de Séphadex 19
k) Séparation des chaînes α et β arpès trypsinolyse ménagée 20
l) Dosage des tryptophanes dans une protéine
m) Etude par cinétique rapide de la réduction de la T-flavoprotéine 21
n) Technique immunologique

CHAPITRE I : ETUDE DES LOCI SENSIBLES A LA TRYPSINE ET DES DOMAINES GLOBULAIRES DANS LE H-FLAVOCYTOCHROME B_2 23

Introduction 24

1 - Hydrolyse trypsique en tampon phosphate 0,1 M pH 7 coupure au locus "a" : expérience n°1 25

2 - Trypsinolyse ménagée du H-flavocytochrome b_2 : Séparation préparative des produits résultant de la coupure au locus "a" 26

3 - Etude des coupures "c" et "d" 27

a) Expérience n° 2
b) Expérience n° 3 28

Corrélation entre hydrolyse, activité enzymatique et perte de flavine prosthétique 29

4 - Paramètres cinétiques du H-flavocytochrome b_2 coupé au locus "a" en (αβ) 30

5 - Etat de polymérisation du H-flavocytochrome b_2 coupé au locus "a" en (αβ) 31

6 - Problème des colorations spécifiques après électrophorèse GPA, SDS des bandes protéiques correspondant aux différents produits d'hydrolyse.

Discussion

CHAPITRE II : CARACTERISATION DES DEUX ESPECES MOLECULAIRES T-FLAVOPROTEINE ET NOYAU CYTOCHROMIQUE b_2 SEPAREES APRES HYDROLYSE TRYPSIQUE. 39

Introduction 40

1 - Préparation du dérivé trypsique flavoprotéique ou T-flavoprotéine et du noyau cytochromique b_2

a) Préparation n° 1
b) Préparation n° 7 42

2 - Caractérisation de la T-flavoprotéine 44

A. Détermination des poids moléculaires

1) Préparation n° 1
a) Poids moléculaire en milieu non dissociant
b) Essais de dépolymérisation

2) Préparation n° 7 45

B. Composition en sous-unités et leur poids moléculaire

2 bis - Caractérisation du noyau cytochromique

3 - Dosages des tryptophanes 47

4 - Etude cinétique de la T-flavoprotéine 48

1) Test d'activité standard
2) Réduction par le L(+)lactate 49
3) Etude des paramètres cinétiques K_m et V_m
4) Etude par cinétique rapide de la réduction de la T-flavoprotéine 50

5 - Etude d'un élément de comparaison entre le H-flavocytochrome b_2 et le S-flavocytochrome b_2 : réactions immunologiques croisées 52

Discussion 53

DISCUSSION GENERALE 56

Abréviations utilisées dans le texte

1/ Matériel enzymatique :

- S-flavocytochrome b_2 : flavocytochrome b_2 extrait de la levure Saccharomyces cerevisiae
- S-noyau cytochromique b_2 : noyau cytochromique dérivé du S-flavocytochrome b_2
- ε_s, α_s, β_s : autres fragments du S-flavocytochrome b_2
- H-flavocytochrome b_2 : flavocytochrome b_2 extrait de la levure Hansenula anomala = b_2H
- H-noyau cytochromique b_2 : noyau cytochromique dérivé du H-flavocytochrome b_2
- H : monomère du H-flavocytochrome b_2
- ε_H, α_H, β_H : autres fragments du H-flavocytochrome b_2
- $(\alpha\beta)_4$: tétramère du flavocytochrome b_2 coupé entre α et β sur chaque protomère
- T-flavoprotéine : flavodérivé obtenu par hydrolyse trypsique à partir du H-flavocytochrome b_2
- FMN : flavine mononucléotide
- hème : protohème IX
- cyt. : cytochrome

2/ Produits divers et méthodes :

P.M.S.F. : Fluorure de phénylméthane sulfonyl

S.D.S. : dodécyl sulfate de sodium

E.D.T.A. : acide éthylène diamine tétraacétique

L.P.E. : lactate - pyrophosphate de sodium - EDTA

GPA, SDS : gel de polyacrylamide 0,1 % S.D.S.

D.E.A.E. : diethylaminoéthyl cellulose

Trp : tryptophane

T : trypsine

T.N. : activité moléculaire

La mitochondrie sert de support à des systèmes multienzymatiques d'oxydoréduction couplés à des systèmes phosphorylants impliqués dans l'apport énergétique essentiel aux organismes. Ces réactions d'oxydoréduction consistent en un transfert ordonné d'électrons le long d'une chaîne "respiratoire" dont le dernier accepteur est l'oxygène. Les maillons terminaux de cette chaîne sont des flavoprotéines, une ubiquinone et des cytochromes b, c_1, c et a la plupart fortement liés à la membrane mitochondriale interne ; leur isolement à l'état pur est difficile.

En 1946, Bach et coll. (1) ont montré que l'activité L(+)lactate deshydrogénase décelée par Bernheim (2) dans la levure aérobie Saccharomyces cerevisiae, était liée à un enzyme de nature hémoprotéique qu'ils dénommèrent: "cytochrome b_2".

Ultérieurement, Appleby et Morton mirent au point une méthode de purification de cet enzyme (3) et le décrivirent (4,5,6) ainsi que Boeri et coll. (7,8) la présence d'un coenzyme flavinique, le flavinemononucléotide, en proportion équimoléculaire avec un protohème IX fut mise en évidence (9,10).

La nature mitochondriale de cet enzyme, sa capacité à être induit par l'oxygène en même temps que l'ensemble du système respiratoire (Somlo et Slonimski (11,12)), le fait qu'il pouvait atteindre des concentrations similaires à celle du cytochrome c lorsqu'il était induit par le L-lactate (13) donnèrent à penser qu'il s'agissait effectivement d'un constituant de la chaîne "respiratoire".

Facilement solubilisé -tout comme l'est le cytochrome c- il fut considéré comme un moyen d'accéder à la connaissance des transferts électroniques au niveau flavinique et cytochromique de cette chaîne et par là même très étudié, principalement en France sous l'impulsion de F. Labeyrie et A. Baudras.

Récemment Pajot et Claisse (14) ont montré -confirmant son rôle physiologique- que le flavocytochrome b_2 peut constituer le maillon d'une mini-chaîne de transport d'électrons capable de coupler in vivo l'oxydoréduction des systèmes L(+)lactate/pyruvate et cytochrome c. Ce couplage permet le fonctionnement des derniers éléments de la chaîne respiratoire principale (cytochrome c et cytochrome oxydase), en particulier la conservation du site III de phosphorylation qui leur est associé lorsque la chaîne respiratoire principale est bloquée au niveau du cytochrome b par l'antimycine A (voir figure 1).

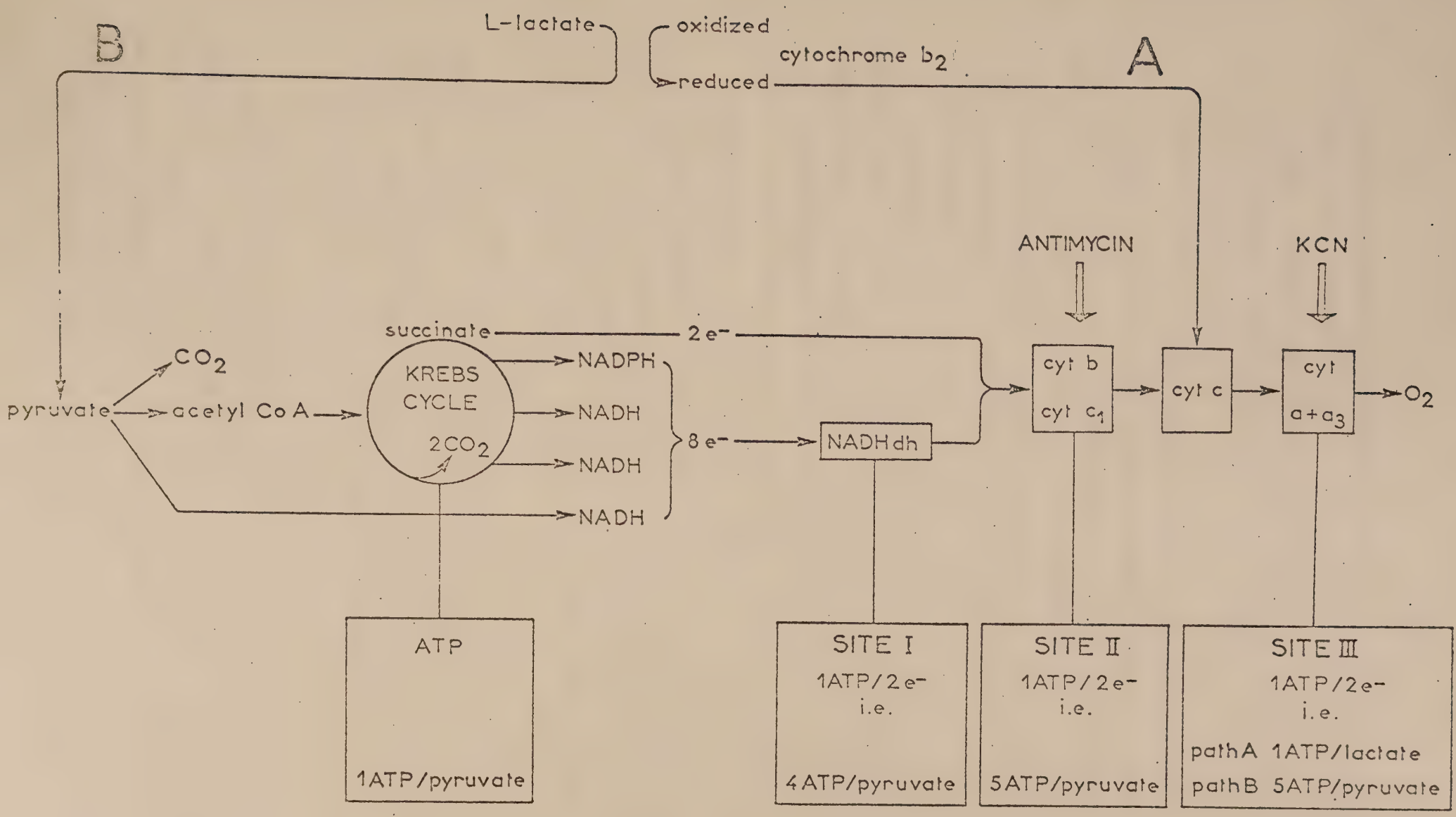


Schéma I : Séquence des transporteurs d'électrons et sites de phosphorylation associés dans la chaine respiratoire principale de la mitochondrie de levure : intégration du flavocytochrome b_2. (d'après Pajot, P. and Claisse, M.L. (14)).

Les deux groupements prosthétiques : flavine et hème interviennent dans ce transport à la jonction d'une voie à deux électrons (lactate) avec une voie à un électron (cytochrome c). Le mécanisme réactionnel de cette déshydrogénase flavocytochromique a été étudié de façon très détaillée, notamment par Capeillère-Blandin et coll. (15, 16).

Les deux premières étapes intramoléculaires ont été définies :

a) la première , la plus lente, donc le processus limitant la réaction catalytique globale, met en jeu la déshydrogénation du L(+)lactate couplée à la réduction du groupement flavinique en flavohydroquinone.

b) la seconde étape est le transfert intramoléculaire d'un électron de la flavine hydroquinone à l'hème b prosthétique, donnant une flavine semiquinone et le ferrohème.

La séquence de ces deux étapes souligne les deux fonctions dépendantes de cet enzyme : un rôle de déshydrogénase et un rôle de cytochrome, accepteur spécifique de cette déshydrogénase. Le problème se pose de comprendre quelles sont les structures qui permettent l'échange rapide intramoléculaire entre flavine et hème et comment se sont créés ces structures sur le plan évolutif.

Que sait-on de la structure de cet enzyme ?

Le flavocytochrome b_2 (=L(+)lactate cytochrome c oxydoréductase = E.C.1.1.2.3) de la levure Saccharomyces cerevisiae (=S-flavocytochrome b_2) est actif sous sa forme tétramérique (235 000 - 240 000 daltons) (17, 18). Chaque protomère ($\simeq$ 58 000 daltons), constitué d'une seule chaîne polypeptidique (19), porte un hème et une flavine (20, 21).

Certains arguments avaient permis de faire des hypothèses sur quelques aspects structuraux du protomère. En effet, lors de sa préparation en absence d'un inhibiteur de protéases, le S-flavocytochrome b_2 subit sur chaque protomère une coupure protéolytique majeure aux deux tiers de la chaîne, conduisant à deux fragments en première approximation complémentaires : α (36 000 daltons) et β (21 000 daltons) (22, 23).

Cette coupure, témoignant de l'existence d'une zone polypeptidique fragile de grande accessibilité, et la résistance de l'ensemble $(\alpha\beta)_4$ à une protéolyse ultérieure ont amené à l'hypothèse que chaque protomère pourrait avoir une structure biglobulaire avant la protéolyse (24). Cette hypothèse de biglobularité fut également formulée à partir de résultats obtenus en étudiant l'hydrolyse trypsique d'un flavocytochrome b_2 extrait d'une autre levure : Hansenula anomala (H-flavocytochrome b_2). Dans celui-ci le protomère est coupé préférentiellement

au même locus "a" que dans l'enzyme apparemment homologue de Saccharomyces cerevisiae (25).

Pour quelques autres protéines, il a été également montré qu'il existait des zones de coupures protéolytiques préférentielles aboutissant à la séparation de domaines globulaires. Citons le cas des immunoglobulines (26), de la β-galactosidase d'E.coli (27) et de la DNA polymérase d'E.coli (28).

Quelquefois la coupure protéolytique permet de séparer les activités enzymatiques quand il s'agit d'enzymes bifonctionnels. L'exemple le plus représentatif est celui de la DNA polymérase d'E.coli qui a pu être scindée par la subtilisine en un globule portant l'activité 3'⟶ 5' exonucléase et un globule portant l'activité 5'⟶ 3' exonucléase (28, 29).

L'hypothèse que des domaines globulaires élémentaires dans une protéine pourraient être chacuns associés à une fonction élémentaire a été faite en particulier par Rossman, se fondant sur l'étude des modèles tridimentionnels d'une série de déshydrogénases et de kinases (30). Ces domaines se seraient trouvés associés covalemment dans les protéines à la suite de fusions de gènes (30).

Dans notre cas, il était tentant de penser que chacun des globules α et β portait son coenzyme propre et que l'action des protéases coupant le pont peptidique reliant α à β fragmentait le protomère en une flavoprotéine et en un cytochrome. Ce pont peptidique aurait alors correspondu à la trace d'une ancienne fusion de deux gènes codant initialement pour deux protéines séparées (25).

Deux arguments au moins étaient en faveur de cette hypothèse :
1/ De fait, dans d'autres systèmes que le flavocytochrome b_2, en particulier dans la chaîne respiratoire principale mitochondriale ou dans les microsomes de foie, on retrouve les deux fonctions flavodéshydrogénase et cytochrome type b portées par des molécules différentes, toutes deux fortement attachées aux membranes, sur lesquelles elles sont probablement topologiquement voisines.

2/ Il a déjà été souligné qu'effectivement la zone de raccord entre deux entités protéiques se trouvant "soudées" en une même chaîne à la suite d'une fusion de gène serait peu structurée, donc facilement mise en forme pour son insertion dans la poche active d'une protéase, comme cela a été discuté par Goldberg pour la β-galactosidase (27).

Pour essayer de tester cette hypothèse, Ninio et coll. dans notre laboratoire ont tenté de séparer les deux globules α et β du S-flavocytochrome b_2 et de caractériser leurs fonctions. Pour cela ils ont utilisé une filtration moléculaire en milieu dénaturant de l'enzyme coupé en α et β .

La renaturation des chaînes α et β séparées, en présence de protohème IX et de FMN a montré que le fragment α fixait l'hème, mais que ni α seul, ni β seul ne pouvaient refixer le coenzyme flavinique dans les conditions étudiées. Par contre la présence simultanée d'α et de β , donc la reformation du protomère (αβ) permettait la refixation du FMN.

De telles expériences ne permirent pas de mettre en évidence un globule flavoprotéique mais démontrèrent clairement la nécessité de l'association des deux globules α et β pour l'intégrité du site du FMN (31).

Si la structure complexe du flavocytochrome b_2 résulte d'une fusion entre deux gènes codant initialement pour α et pour β , cette fusion n'aurait donc pas eu pour "finalité" le regroupement des deux fonctions flavodéshydrogénase et cytochrome. Nous avons été amenés à suggérer une autre hypothèse concernant un tel regroupement.

Depuis longtemps on sait préparer (32) un dérivé trypsique de faible poids moléculaire (11 000 daltons) du flavocytochrome b_2 contenant l'hème et ne contenant pas la flavine. Ce dérivé constitue un noyau cytochromique qui résiste à la trypsine dans des conditions où le reste de la chaîne est totalement hydrolysé.

Il a été montré qu'il est inclus dans le globule α (22) et qu'il constitue en fait la partie N terminale de la chaîne polypeptidique unique formant le monomère (33).

Ce dérivé hémoprotéique -le noyau cytochromique b_2- a été trouvé remarquablement semblable au cytochrome b_5 des microsomes de foie par son poids moléculaire, son potentiel d'oxydoréduction et ses propriétés spectrales d'absorbance dans le visible (34), de R.P.E. (35) et de R.M.N. (protons de la poche héminique, de l'hème, et d'un résidu voisin d'un tryptophane) (36,37). Sa séquence (38, 39) présente une homologie très significative avec celle du cytochrome b_5. Comparée au modèle tridimentionnel établi pour ce dernier, elle est compatible avec l'identité du repliement de la chaîne en structures secondaires et tertiaires et en particulier avec une construction très voisine de la poche héminique (figure 24).

Le faible poids moléculaire de ces deux entités cytochromiques les classant avec le cytochrome c comme les plus petits cytochromes connus (si l'on excepte quelques cytochromes de type c de bactéries photosynthétiques), ainsi que leur apparente homologie nous amènent à les considérer comme des cytochromes "élémentaires" formés au cours de l'évolution par différentiation à partir d'un ancêtre commun, élémentaire lui aussi.

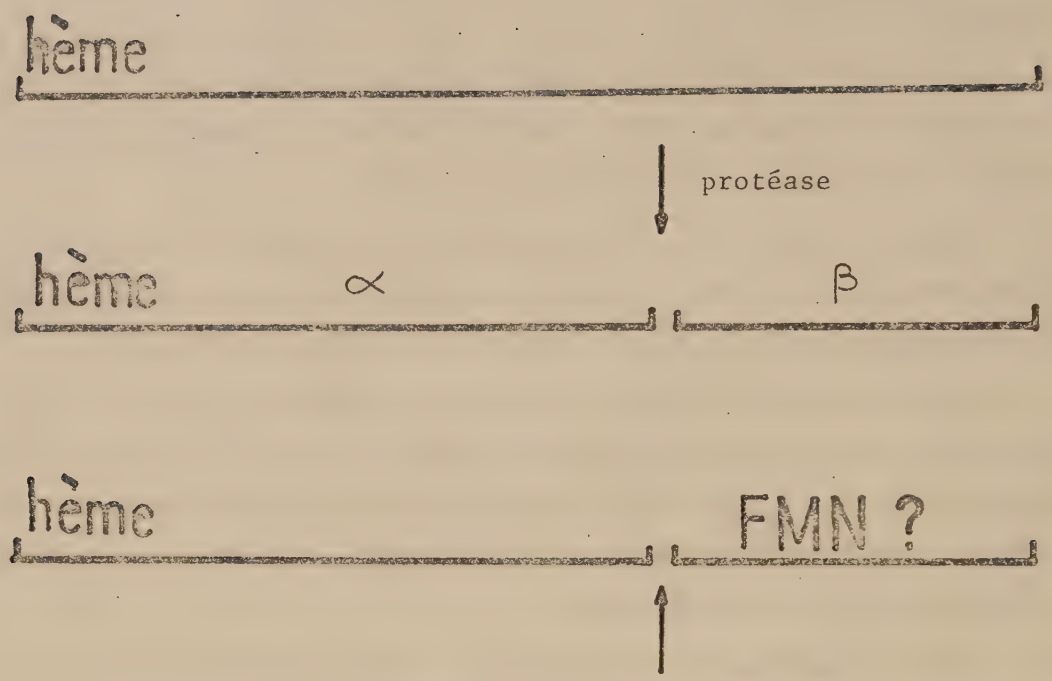


Figure 2 : Hypothèses concernant la structure du flavocytochrome b_2

1 - monomère "intact" (à gauche, extrémité N terminale)

2 - action des protéases : coupure au locus "a"

3 - ancienne hypothèse

4 - loci d'attaque protéolytique (25)

5 - notre hypothèse de travail

La partie N terminale de la chaîne complexe du flavocytochrome b_2 étant constituée par ce noyau cytochromique b_2 "élémentaire", nous nous sommes demandés si tout le reste de la chaîne n'en constituait pas la partie flavo-déshydrogénase.

Nous inspirant d'un schéma proposé par Naslin et coll. concernant la position des zones hypersensibles aux protéases, mais refusant l'idée que l'hypothétique fusion de gènes regroupant les deux fonctions aurait eu lieu entre deux gènes codant initialement pour α et pour β , nous avons voulu étudier si les points de coupures "c" ou "d" (voir figure 2) ne constituaient pas la trace réelle de cette fusion.

Les problèmes sur lesquels nous avons tenté d'avoir des informations concernent donc la caractérisation de la structure tertiaire du H-flavocytochrome b_2, en particulier la mise en évidence de l'ensemble des points de la chaîne sensibles aux protéases et la possibilité de fragmenter celle-ci en domaines globulaires.

Au niveau des relations structure-fonction, nous nous sommes proposés d'étudier les rapports existant entre de tels domaines et les deux fonctions, cytochrome et déshydrogénase, de l'enzyme.

En fait la possibilité qu'une coupure protéolytique puisse séparer la partie cytochrome de la partie déshydrogénase était apparue au cours d'expérience préliminaires faites par O. Groudinsky.

Notre étude comprendra deux parties :

- Dans un premier temps nous ferons une étude cinétique de la protéolyse trypsiqu du H-flavocytochrome b_2, caractérisant chaque fragment par sa masse molaire et sa concentration en fonction de la durée de la réaction.

Avec ces données nous établirons le schéma réactionnel de la protéolyse. Evaluant les constantes de vitesse de formation ou de dégradation de chaque constituant, c'est à dire décrivant en quelque sorte les réactivités relatives des diverses zones senbibles à la protéolyse, nous serons amenés à traduire cette cinétique en terme de "ponts sensibles" et de "domaines globulaires".

- Dans une seconde partie, nous décrirons un dérivé flavoprotéique obtenu par hydrolyse trypsique du flavocytochrome b_2, définissant en particulier sa composition en domaines globulaires. Ses propriétés de flavodéshydrogénase seront caractérisées par ses paramètres cinétiques.

Enfin, à la lueur de ces résultats nous concluerons en proposant un modèle pour la structure tertiaire du H-flavocytochrome b_2 et en tentant de relier ce modèle à celui du système microsomal du cytochrome b_5.

C'est au fond le problème de la différentiation évolutive du flavocytochrome b_2 que nous voulons contribuer à éclaircir.

MATERIEL ET METHODES

A - MATERIEL :

a) Levure

La souche Hansenula anomala est cultivée par M. Hours au service de fermentation et d'extraction de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles du C.N.R.S. à Gif-sur-Yvette.

Hansenula anomala est une levure aérobie stricte. La source de carbone utilisée est le lactate de sodium.
(Composition du milieu de culture décrite dans (44)).

Les levures sont récoltées en début de phase stationnaire de croissance, lyophilisées, et conservées sous cette forme en chambre froide jusqu'à l'extraction de l'enzyme. Des tests faits au laboratoire (42) ont montré qu'aucune altération de l'activité flavocytochrome b_2 n'intervenait après des temps de stockage de plusieurs mois à l'état lyophilisé. Par contre les rendements en enzyme actif par kilo de levure sont très variables.

b) H-flavocytochrome b_2

L'extraction et la purification de l'enzyme se font d'après la méthode de Baudras et Spyridakis (43, 44) avec l'introduction d'une étape supplémentaire très intéressante (Naslin et Labeyrie - modifications non publiées). La préparation du H-flavocytochrome b_2 consiste principalement en une autolyse de la levure en présence de butanol, une chromatographie du surnageant d'autolyse sur D.E.A.E. cellulose et en des étapes de purification par précipitations fractionnées à l'acétone et au sulfate d'ammonium.

α) autolyse

750 g de levure lyophilisée sont pulvérisés pendant quelques secondes avec un mixeur Braun. La poudre obtenue est alors mélangée à une solution dite L.S.A. (lactate de sodium 0,1 M ; E.D.T.A. 0.25 mM ; P.M.S.F. 0,33 mM ; solution faite dans l'eau bidistillée ; pH 6) à laquelle on a ajouté du butanol - 1 - (0,44 M final). On ajoute un litre de cette solution d'autolyse pour 125 g de levure sèche. La pâte formée est homogénéisée par un second passage au mixeur. L'autolyse se poursuit sous agitation constante durant 2 h 30 mn à 30°C.
Une centrifugation (17 000 g, 60 mn, 5°C) permet de séparer un surnageant limpide contenant l'activité flavocytochrome b_2, d'un culot compact formé de débris cellulaires.

β) Chromatographie

Le surnageant (environ 4 500 ml) est alors mélangé à une résine DEAE cellulose Whatman D.E.52 (1 500 ml) préalablement équilibrée avec le milieu dit L.S.A. (6°C). L'adsorption de l'activité flavocytochrome b_2 sur la résine se fait en moins de 15 mn. Des tests antérieurs faits au laboratoire (42) ont montré qu'environ 0,3 % seulement de l'activité ne s'adsorbait pas durant ce laps de temps. La résine est alors lavée abondamment sur un verre fritté n° 2 avec du L.S.A. puis du tampon phosphate 0,1 M , lactate 100 mM, EDTA 25 mM, pH 7.0. Une fraction protéique contenant le flavocytochrome b_2 reste adsorbée sur la résine alors que d'autres protéines dont le cytochrome c (qui est récupéré) sont évacuées par les différents lavages. La résine, à laquelle le H-flavocytochrome b_2 donne une teinte rose est versée dans une colonne (Ø : 10 cm ; L = 60 cm) et l'enzyme est élué par le tampon phosphate de lavage additionné de 15 % de sulfate d'ammonium (pH 7,6). Le faible volume de la fraction rouge recueillie (environ 250 ml) simplifie la manipulation dans les étapes ultérieures de purification. A ce stade la préparation peut être laissée en chambre froide pendant 16 heures. Une dialyse de deux heures contre un tampon K_2HPO_4, NaH_2PO_4 0,2 M ; lactate 0,1 M ; EDTA 0,25 mM ; pH 7.0, enlève la plus grande partie du sulfate d'ammonium.

γ) Précipitations fractionnées

Une première précipitation à 30 % d'acétone faite à basse température (- 5°C), suivie d'une centrifugation (48 000 g ; 10 mn) permet l'élimination d'un culot ne contenant pas le flavocytochrome b_2. Le surnageant clair est lui-même précipité à 42 % de concentration finale en acétone (296 ml d'acétone par litre de surnageant). Après centrifugation le culot rouge est repris dans 40 ml de tampon et solubilisé pendant 2 heures à 0° sous agitation magnétique douce. La solution est centrifugée. Le surnageant rouge, limpide est dialysé une nuit contre le tampon 27,5 % finaux de saturation en sulfate d'ammonium. Après centrifugation on obtient un culot contenant peu de l'activité flavocytochrome b_2 (≃ 1 %). Le surnageant est précipité (30 % de saturation finale) par addition de sulfate d'ammonium.

Une centrifugation (10 mn, 40 000 g) fournit un culot rouge contenant le flavocytochrome b_2. Le surnageant est reprécipité à 32,5 % de saturation finale en sulfate d'ammonium ; il fournit après centrifugation un second culot rouge contenant la plus grande partie de l'enzyme (≃ 200 mg), celui-ci étant de qualité sensiblement égale à celui obtenu à partir de la précipitation à 30 %.

δ) Conservation de l'enzyme

Les culots rouges des deux précipitations à 30 et 32,5 % de saturation en sulfate d'ammonium sont redissous dans un minimun de tampon (phosphate 0,1 M ; lactate 100 mM ; EDTA 0,25 mM) et reprécipités à 50 % de saturation en sulfate d'ammonium. Cette suspension est conservée sous azote à 4°C.

c) Trypsine

La trypsine utilisée pour les hydrolyses est la trypsine type TRTPCK du pancréas de boeuf (Worthington Biochemical Corporation) c'est à dire pré-traitée par la L(1-Tosylamido 2-phényl) éthyl chlorométhyl cétone pour inhiber l'activité chymotrypsique contaminante, lui conférant ainsi une spécificité plus stricte. Les solutions sont préparées extemporanément dans HCl 0,1 mM pour chaque hydrolyse. Le pH de la solution d'enzyme n'est pas modifié par l'addition de la solution de trypsine.

Selon les cas les concentrations en trypsine sont calculées à partir d'une pesée à la balance de précision (quantités supérieures à 10 mg) ou dosées spectrophotométriquement à 280 nm en utilisant la valeur E (1 cm, 1mg/ml) = 1,5 (45). Le poids moléculaire adopté est celui indiqué par le fabricant (23 800 daltons).

L'activité trypsique est calculée selon la méthode de Hummel (46) en mesurant l'accroissement d'absorbance à 247 nm dû à l'hydrolyse du p.toluènesulfonyl-L-arginine méthyl ester (T.A.M.E.). L'activité de la trypsine stock, conservée en dessicateur à -18°C, n'a pas varié de façon significative au cours des mois. Exprimée en unités/mg de protéine elle était toujours voisine de 255, c'est à dire 255 micromoles de TAME hydrolysés par minute (à 25°C, pH 8,1 et en présence de $CaCl_2$ 11,1 mM) par milligramme de trypsine.

d) Produits divers

- Acrylamide et bis acrylamide, ainsi que le bleu de Bromophénol et le T.E.M.E.D. (N, N, N', N' tetramethyléthylènediamine) sont des produits "Canal Industrial Corporation".
- Le persulfate d'ammonium, un produit Billault.
- Le S.D.S. (Dodecyl sulfate de sodium : laurylsulfate de sodium) : Serlabo.
- Le noir d'amidon : Apelab.
- inhibiteur trypsique du soja : Sigma
- P.M.S.F. : Merck
- Guanidine "ultra pure" de chez Mann Research Lab. " (fluorescence) ou Carlo Erba (colonnes de Séphadex).

Tous les produits courants (sels, solvants organiques ...) sont de qualité Prolabo R.P. ou équivalents.

Les solutions sont faites dans l'eau désionisée puis distillée en appareil en quartz.

B - METHODES

a) Préparations du L(+)lactate

L'acide L(+)lactique (Sigma) est délactonisé par chauffage à 100° pendant 15 minutes. Il est alors neutralisé par la soude. Les concentrations en L(+)lactate de sodium sont déterminées à partir de la mesure des quantités de ferricyanure réduites dans une réaction catalysée par le S-flavocytochrome b_2 selon (47).

b) Préparation de la solution de flavocytochrome b_2 à partir de l'enzyme stock

La quantité de flavocytochrome b_2 nécessaire à une expérience donnée est prélevée à partir de la suspension stock 50 % de saturation en sulfate d'ammonium. Après centrifugation à 4°C (10 mn, 33 000 g) et élimination du surnageant, le culot rouge est repris dans un minimum de tampon dit L.P.E. (D.L. lactate 0,3 M, pyrophosphate de sodium 50 mM, EDTA 0,1 mM). Cette fraction est déposée sur une colonne (Ø = 1cm ou 2,5 cm, l = 10 cm) de Séphadex G-25 qualité "fine", équilibrée en tampon pH 7 ou pH 8 . Cette filtration débarasse l'enzyme du sulfate d'ammonium résiduel contenu dans le culot initial. L'enzyme est ensuite dilué avec le tampon L.P.E. jusqu'à la concentration finale désirée (facteur de dilution ≃ 6 pour une concentration finale de 3,5 mg/ml).

c) Mesure des concentrations en enzyme

La détermination des concentrations en flavocytochrome b_2 se fait (d'après les spectres d'absorption tracés au spectrophotomètre Cary 15) à 423 nm, longueur d'onde correspondant au maximum d'absorbance déterminé pour la bande γ de l'hème réduit. $\varepsilon_{423\ nm} = 183\ mM^{-1}cm^{-1}$ pour le flavocytochrome b_2 réduit par un excès de dithionite de sodium (21).

d) Mesures d'activité standard du H-flavocytochrome b_2

L'activité de l'enzyme est détectée spectrophotométriquement à 420 nm par la réduction du ferricyanure de potassium (Zeiss, PMQ2 couplé à un enregistreur Sargent SRLG) dans le milieu standard tamponné suivant : phosphate monopotassique disodique 66 mM, L(+)lactate 10 mM, ferricyanure de potassium 1 mM ; pH 7,2, à 30°C. Les cinétiques ne sont pas linéaires. Les vitesses initiales sont calculées par la pente initiale. L'activité moléculaire (T.N.) est exprimée en électrons équivalents transférés par mole d'hème et par seconde. Sa dimension est donc des s^{-1}. De façon courante sont obtenus des T.N. voisins de 900 s^{-1}. Les maxima enregistrés sont d'environ 1 200 s^{-1}.

e) Conduite des cinétiques d'hydrolyse

La solution de flavocytochrome b_2, de concentration et volume connus, est équilibrée en bain thermostaté à la température voulue pour la trypsinolyse. Cette dernière est déclenchée par mélange avec une solution de trypsine elle-même équilibrée à la même température. Au cours de l'hydrolyse et à des temps variables, des échantillons protéiques (de 10 à 30 µl suivant les concentrations du flavocytochrome b_2) sont prélevés et congelés immédiatement dans l'azote liquide afin que l'action de la trypsine soit stoppée rapidement et efficacement. Les temps portés sur les courbes correspondent aux temps de congélation. Les échantillons peuvent être conservés au congélateur à -24°C jusqu'à leur analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, 0,1 % SDS. D'autres échantillons sont parfois prélevés pour des mesures d'activité ou de fluorescence flavinique (cf expérience n°3). Dans de tels cas les temps indiqués correspondent toujours au moment des mesures et non aux temps des prélèvements qui leurs sont inférieurs de 30 s à 1 mn selon les cas.

f) Electrophorèses

Les électrophorèses en gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium (GPA, SDS), sont effectuées en tubes d'après la méthode décrite par Weber et Osborn (41). Cette méthode impliquant la dénaturation des protéines et en particulier la dissociation du tétramère en ses monomères consitutifs, on pouvait s'attendre à l'obtention de fragments polypeptidiques ayant au maximum le poids moléculaire du monomère soit environ 60 000 daltons. Nous avons donc choisi une réticulation des gels permettant d'explorer la gamme (60 000 - 10 000) daltons en travaillant à 10 % de concentration en acrylamide. (Caractéristiques des gels : 50 mM phosphate, 10 % acrylamide ; 0,1 % SDS pH 7,2 longueur ≃ 10 cm Ø intérieur des tubes : 5 mm).

Les échantillons protéiques congelés sont dénaturés par l'addition de 100 µl d'une solution 1 % SDS, 1 M β-mercaptoethanol, urée 8 M, phosphate 100 mM, 0,005 % bleu de bromophénol, et incubés 45 mn à 45°C. Un mélange de protéines étalons est traité de la même façon. Des aliquotes de volumes identiques de ces diverses solutions sont déposées sur les gels. Douze gels sont traités simultanément dans un appareil d'électrophorèse en tubes " Apelab" sous une tension de 70 V délivrant 8 mA par tube, jusqu'à ce que le colorant témoin de la migration arrive à environ 1 cm de l'extrémité des gels. La longueur de chaque gel (l_1), ainsi que la distance parcourue par le bleu de bromophénol (d_B) sont mesurées. Les gels sont alors colorés pendant 45 mn dans une solution 0,1 % amidoblack, acide acétique-méthanol-eau 1:4:4 (v/v/v) puis décolorés pendant

24 heures dans un mélange acide acétique-méthanol-eau 1:4:5 (v,v,v) change plusieurs fois. Ils sont ensuite "gonflés" par immersion dans le même mélange mais dans les proportions 2:2:17 (v,v,v). Tous les gels d'une même expérience sont ainsi traités simultanément et photographiés ensemble sur un même positif transparent avec un appareil Polaroid. Ces positifs sont ensuite "densitométrés" grâce à un microdensitomètre Chromoscan équipé d'un intégrateur de surfaces.

g) Traitement des données expérimentales

α) Calcul des mobilités

Les mobilités sont calculées en utilisant la formule classique $m = \frac{l_1}{d_B} \cdot \frac{dx}{l_2}$ où d_B est la distance de migration du témoin, le bleu de bromophénol, d_x, la distance de migration de la bande x, l_1 et l_2 les longueurs du gel avant et après gonflement.

β) Evaluation des poids moléculaires

Nous avons utilisé les protéines étalons suivantes :

- Phosphorylase A (Worthington) P.M. : 94 000
- Catalase de foie de boeuf 2X (Sigma) P.M. : 60 000
- Lactate déshydrogénase (") P.M. : 36 000
- Cytochrome c (") P.M. : 11 750

A partir des mobilités trouvées pour ces protéines dans plusieurs électrophorèses, nous avons établi la mobilité moyenne de chacune d'elles.

Le tableau suivant, outre ces mobilités, indique l'écart type σ pour chacune de ces moyennes.

Nota : On rappelle que l'écart type est la racine carrée de la moyenne des carrés des écarts des données, écarts pris par rapport à la moyenne arithmétique de la série.

$$\sigma = \frac{\sum_{i=1}^{n} (X_i - X)^2}{n}$$

Phosphorylase	$\bar{m}$ = 0,098	(moyenne sur 7 valeurs)	σ = 0,034
Catalase	$\bar{m}$ = 0,251	(" " 9 ")	σ = 0,019
L.D.H.	$\bar{m}$ = 0,453	(" " 9 ")	σ = 0,016
cytochrome c	$\bar{m}$ = 0,805	(" " 10 ")	σ = 0,017

La représentation de Log (P.M.) en fonction de la mobilité $\bar{m}$ pour cette série de protéine est une droite dont l'équation est déterminée par régression linéaire.

$$\log (P.M.) = - 2,93 \bar{m} + 11,75$$

Le coefficient de corrélation linéaire pour cette droite r est égal à 0,999.

Les mobilités calculées pour des bandes protéiques correspondant aux composants de l'hydrolysat sont reportées dans l'équation de la droite standard, permettant d'évaluer ainsi le poids moléculaire de chacun de ces composants. Avec ce mode de calcul il peut exister une erreur systématique sur les poids moléculaires mais les relations entre ces poids moléculaires sont connues avec le maximum de précision. (erreur < 5 %).

γ) Détermination quantitative de la composition d'un hydrolysat

Pour une espèce protéique déterminée formant une bande après électrophorèse GPA, SDS, on admet que la coloration par le noir d'amidon, parmi les gels d'une série expérimentale, est proportionnelle à la concentration dans la gamme de concentrations utilisée (jusqu'à 10 µg de protéine déposée sur un gel), et que la photo respecte cette proportionnalité. Par contre, d'une protéine à l'autre, la quantité de coloration fixée peut être différente. Pour étudier l'évolution d'un composant protéique au cours de l'hydrolyse d'un gel à l'autre nous exprimerons donc la coloration d'une bande donnée (surface intégrée sous le pic de densitométrie) en fonction de la somme des colorations de chaque bande contenue dans le même gel (surface totale intégrée sous le profil de densitométrie). Ensuite nous verrons l'évolution de ce pourcentage pour un autre gel. Nous nommerons "concentration relative" la coloration d'une bande exprimée ainsi en pourcentage de la coloration totale dans le gel qui la contient.

δ) Détermination des constantes apparentes de vitesse du 1er ordre

Si on suppose la loi d'apparition ou de disparition d'un fragment protéique comme étant une loi du 1er ordre ($A = ae^{-kt} + b$) on peut calculer la constante de vitesse apparente du 1er ordre :

- pour les constituants qui disparaissent :

$A = A_o \ e^{-kt}$ $\qquad$ $\text{Log } A = - kt + \text{Log } A_o$

La représentation de Log A = f(t) est une droite de pente = - k apparent.

- pour les constituants qui apparaisent :

$(A \text{ final} - A) = A \text{ final } e^{-kt}$ $\qquad$ $\text{Log } (Af - A) = -kt + \text{Log } Af$

La représentation graphique de cette fonction est une droite de pente -k apparent. A_o, A, A_f sont les concentrations en constituant de type "A" exprimées en pourcentage de la coloration totale dans le gel aux temps 0, t et final. Les constantes de vitesse sont calculées par régression linéaire.

Dans les cas où nous exprimons une vitesse maximale de dégradation, nous avons admis une diminution non détectée de 5 % de coloration au temps maximum d'observation t, au niveau d'un plateau apparent. A partir de ce point fictif

et de la valeur du pourcentage de coloration correspondant à ce plateau nous avons calculé la constante de vitesse de la manière habituelle décrite plus haut.

h) Dosage de la quantité de flavine libre dans un échantillon

La flavine oxydée est fluorescente. Lorsque celle-ci est fixée au sein du H-flavocytochrome b_2 (48) ou de la T flavoprotéine qui en dérive, la fluorescence est éteinte totalement. Nous avons utilisé cette propriété pour doser le pourcentage de flavine fixée dans un échantillon en utilisant un fluorimètre construit par le Dr. M. Iwatsubo et décrit ailleurs (48).

L'échantillon à analyser est ajouté à un volume v de tampon. Dans ce milieu seule la flavine libre est fluorescence. Un échantillon de même volume est ajouté à un volume v d'urée 3 M ou 6 M. Toute la flavine contenue dans l'échantillon est alors libérée après quelques dizaines de secondes et sa fluorescence devient détectable. Le rapport: fluorescence dans le tampon/fluorescence dans l'urée, exprime le pourcentage de flavine libre dans la cuve de mesure par rapport à la quantité totale de flavine contenue dans celle-ci. Lorsque les concentrations dans la cuve de mesure sont grandes par rapport à la constante de dissociation, on égalise la valeur expérimentale à la valeur réelle pour la solution stock. C'est le cas des dosages faits dans ce travail $C \simeq 10^{-6}$ M $K_d \simeq 10^{-10}$M (48).

La longueur d'onde d'excitation choisie est 450 nm. La fluorescence est mesurée au maximum d'émission (≃ 530 nm). Les spectres sont corrigés d'une ligne de base faite avec le solvant sans la flavoprotéine à la même sensibilité de l'appareil pour le tampon d'une part, pour l'urée d'autre part.

i) Détermination des coefficients de sédimentation

Les déterminations des coefficients de sédimentation ont été réalisées

1/ Au Centre de Génétique Moléculaire du C.N.R.S. à Gif-sur-Yvette, grâce à la collaboration de Mme Mossé (Centrifugation n° 1 et n°3.

2/ A l'Institut de Biochimie, Biophysique et Phytophysiologie du Centre d'Orsay -Université de Paris XI, grâce à la collaboration de Mme Barnéou (Centrifugation n° 2).

Principe :

Soit r la distance réelle du milieu de la frontière (en absorption) ou du sommet du pic (en Schlieren) à l'axe de rotation. Plusieurs clichés sont pris au cours du temps et on porte Ln r = f(t). La représentation de cette fonction est une droite dont la pente égale 60 w^2 x S_{app} d'où la valeur de S apparent.

Traitement des résultats

Le coefficient de Svedberg apparent est une fonction de la concentration. Nous avons extrapolé les coefficients de sédimentation à concentration nulle en protéine. Pour les mesures faites au voisinage de 0,26 mg/ml (avec le dispositif par absorption lumineuse) une correction due à la concentration n'apporte pas une modification significative des résultats.

Pour les mesures faites à 4,9 mg/ml (Schlieren) la correction peut être importante pour certaines protéines. Dans le cas du H flavocytochrome b_2 intact la pente de la droite $S_{4°C}$ = f (concentration en protéine) n'est que de - 0,07 Svedberg par mg/ml (44), soit ≃ 0,35 Svedberg à la concentration que nous avons utilisée. Les coefficients de Svedberg calculés $S^\circ_{4°}$ solvant ou $S^\circ_{6°}$ (solvant) sont exprimés en $S^\circ_{20°}$, dans l'eau par l'utilisation des coefficients de correction suivants :

$$S^\circ_{20.w} = S^\circ_4 \text{ sol.} \times k_1 \times k_2 \times \frac{k_3}{k_4}$$

avec $k_1 = \frac{\eta T_w}{\eta 20.w}$ $\quad k_1 = 1,5701$ à 4° $\quad k_1 = 1,547$ à 6°C

(donné par les tables)

$$k_2 = \frac{\eta T^{sol}}{\eta T_w} = 1,092$$

$$k_3 = (1 - \bar{v}_{20°,w}, \rho\ 20°,w) = 0,247$$

avec $\bar{v}$ 20°w = 0,754 (17), ρ 20°w = 0,9982

$$k_4 = (1 - \bar{v}_{T\ sol}, \rho\ T\ sol) = 0,240$$

$\bar{v}$ Tsol supposé = 0,744, $\rho\ T_{sol}$ = 1,0214

k_2, k_3 et k_4 sont calculés pour 4°C. Ils sont supposés égaux pour 6°C.

coef. correction : $C = k_1 \times k_2 \times \frac{k_3}{k_4}$ $\quad C_{4°} = 1,765$ $\quad C_{6°} = 1,739$

Centrifugation n°1 : Le flavocytochrome b_2 est coupé par la trypsine ((b_2H) = 4,9 mg/ml ; trypsine 0,6 mg/ml activité : 287 u/mg; 20°C ; L.P.E. pH 8.0) . L'hydrolyse (40 s) est stoppée au stade de la première coupure ($c\beta$) (voir signification de cette nomenclature dans "Résultats") par l'action conjugée du P.M.S.F. (3 mM final) et d'un refroidissement brusque dans l'azote liquide jusqu'à la température de 0°. L'échantillon est dilué avec du tampon L.P.E. jusqu'à ce que son absorbance à la longueur d'onde d'observation (423 nm) soit égale à 0,8 (0,26 mg/ml).

Une centrifugation en milieu homogène à 4°C est alors effectuée dans une ultracentrifugeuse analytique Beckman équipée d'un régulateur de vitesse mécanique et d'un monochromateur. (vitesse de rotation : 59 780 rpm) la détection est faite par absorption lumineuse.

Centrifugation n°2 : Le même échantillon que celui préparé pour la centrifugation n°1 est conservé à 0°C à la concentration de 4,9 mg/ml. Il est centrifugé à 67 770 rpm dans une ultra centrifugeuse analytique Beckman à 6°C (cellule 12 mm, 4 degrés).

Centrifugation n°3 : L'échantillon de flavoprotéine a été dialysé pendant 15 heures à 0°C contre la solution tamponnée suivante :
Tris 150 mM ; D.L lactate 50 mM ; Urée 40 mM pH 7,2.
Il a été centrifugé dans les mêmes conditions que pour la centrifugation n°1 (observation à 450 nm).

j) Chromatographie sur colonne de Séphadex

Les gels de Séphadex sont préparés selon la méthode conseillée par le fabricant. Après gonflement dans l'eau bidistillée à 90°C pendant plusieurs heures, le gel est débarassé de ses particules les plus fines. Il est ensuite lavé au tampon, refroidi lentement et versé dans une colonne Pharmacia de diamètre et de longueur variables selon les expériences. Toutes les colonnes sont préparées et maintenues en armoire froide à 4°C et les élutions sont faites à débit constant (pompe péristaltique Technicon).Le choix du débit de la pompe dépend de la nature du Séphadex choisi. Il doit être de toute façon inférieur au débit propre de la colonne.

Nous utilisons les gels de Séphadex pour leurs propriétés de séparer les constituants d'un mélange en fonction de leur taille (rayon de Stokes). Pour des protéines globulaires, la séparation se fera en première approximation en fonction du poids moléculaire. Selon les cas nous utiliserons deux façons de caractériser un constituant: soit par son volume d'élution si la colonne n'a pas été étalonnée avec des protéines de poids moléculaire connu, soit par son K_{av} si la colonne a été étalonnée.

Les volumes d'élution sont calculés à partir de l'enregistrement continu de l'absorbance à deux longueurs d'onde simultanées réalisé avec un absorptiomètre Seive.

Le k_{av} est le coefficient de partage entre la phase liquide et la phase gel :

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

où V_e est le volume d'élution du constituant, V_o le volume d'élution d'un constituant totalement exclu (Bleu dextrane 2 000 Pharmacia), V_t le volume total

du gel. Pour un gel donné il y a linéarité entre le k_{av} et le logarithme du poids moléculaire sur une zone nommée : domaine de fractionnement.

k) Séparation des chaines α et β après trypsinolyse ménagée

Une colonne de Séphadex G-75 superfine (Ø 2,5 cm, L = 1 mètre) est équilibrée à 4°C sous azote avec le tampon suivant : Tris 0,1 M ; D.L lactate 50 mM, P.M.S.F. 1 mM, guanidine HCl 1 M, β mercaptoethanol 0,1 M ; E.D.T.A. 20 µM, pH 6,3. 54 mg de H-flavocytochrome b_2 sont hydrolysés à 21°C par la trypsine à pH 8 (H-flavocytochrome b_2 : 3,5 mg/ml ; trypsine 0,6 mg/ml pendant 50 secondes) L'hydrolyse est arrêtée par l'action simultanée du P.M.S.F. 2 mM et du froid (0°C). L'hydrolysat est précipité, sous contrôle du pH,à 75 % de saturation en sulfate d'ammonium et centrifugé 15 mn à 20 000 g à 0°C. Le culot est incubé pendant 15 minutes à 4°C dans 300 µl du tampon de la colonne. 5 % de sucrose sont ajoutés à cette solution qui est déposée sur la colonne et éluée (débit 0,16 ml/mn). Un échantillon est conservé pour une électrophorèse GPA, SDS. L'élution est suivie à l'absorptiomètre à deux longueurs d'ondres simultanées (UV et visible). A la sortie de la colonne les fractions sont spectrées et regroupées en lots qui sont mis à renaturer séparément dans un tampon Tris 0,2 M, ajusté à pH 6,5 avec de l'acide lactique, contenant du FMN, du β-mercaptoéthanol 0,1 M, du P.M.S.F. 1 mM et de l'EDTA 20 µM. Le tampon est changé plusieurs fois en 60 heures. Les derniers tampons de renaturation sont sans β-mercaptoéthanol. Les fractions renaturées sont précipitées à 85 % de saturation en sulfate d'ammonium et redissoutes dans un minimum de tampon. Ces solutions sont passées sur une colonne de Séphadex G-25 (Ø 1 cm, L = 10 cm) afin d'être débarassées de la flavine libre avant d'être testées en électrophorèse et en fluorescence. On prend soin de ne garder que la fraction de tête qui ne risque pas d'être contaminée par le pic d'élution de la flavine libre.

1) Dosage des tryptophanes dans une protéine

La quantité de tryptophane contenue dans un échantillon protéique est déterminée par une analyse fluorométrique dans l'ultraviolet selon la méthode de P. Pajot (49,50).Cette méthode est fondée sur l'uniformisation de l'environnement des chromophores aromatiques en guanidine-HCl 6 M. L'échantillon protéique en guanidine 6 M, est excité à 295 nm. Sa fluorescence (à 354 nm) est mesurée. Des aliquotes d'une solution de tryptophane de concentration connue sont ensuite ajoutés dans la cuve de mesure. Les variations de fluorescence mesurées, on porte fluorescence = f (concentration de tryptophane). L'extrapolation de la droite passant par les points expérimentaux d'étalonnage donne la concentration en tryptophane dans l'échantillon testé. Cette concentration expérimentale doit être corrigée d'un facteur 1,11, le tryptophane lié dans une protéine étant

1,11 fois plus fluorescent que le tryptophane libre.(50)

m) Etude par cinétique rapide de la réduction du flavodérivé par le lactate

Cette étude est faite en collaboration avec M. Iwatsubo avec un appareil de "stopped flow" Gibson Durrum modifié par lui-même de la manière précédemment décrite dans (51). Les tracés oscilloscopiques sont mémorisés dans un "Tracor Norther NS 570" et enregistrés sur un enregistreur : Sefram TGM 164. Le temps mort de l'appareil est de 2,2 ± 3 ms (51).

La réduction de la flavine par le L-lactate est observée à 450 nm, longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption du F.M.N. oxydé dans le visible. L'échantillon contenait un faible pourcentage d'hème résiduel % < 5 %.

Nous avons traité les données expérimentales selon la méthode de Guggenheim (52).

soit $A = ae^{-kt} + b$

pour $t = 0 \quad A_o = a + b$

$t = \infty \quad A_\infty = b$

$$A = (A_o - A_\infty)e^{-kt} + A_\infty$$

$$dA = (A_o - A_\infty)e^{-kt}dt + A_\infty$$

pour des dt et des dA très petits on peut assimiler différentielle et dérivée

$$\Delta A = - k(A_o - A_\infty)\, e^{-kt}\, \Delta t + A_\infty$$

si on prend pour Δt une valeur constante

$$\text{Log } \Delta A = (\text{Log } k + \text{Log } (A_\infty - A_o) + \text{Log } \Delta t) - kt$$

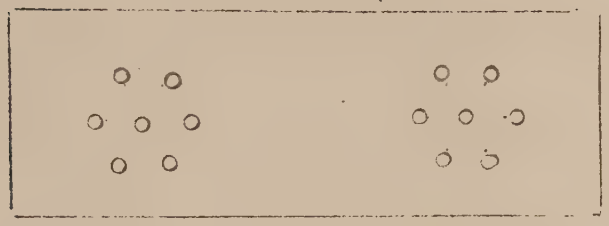
La représentation théorique de Log $\Delta A = f(t)$ est une droite de pente -k

n) Technique immunologique

L'antisérum de lapin contre le S_x-flavocytochrome b_2 ainsi que celui contre le S_x-noyau cytochromique b_2 ont été préparés par M. B. Guiard selon une méthode décrite ailleurs (54). Le test immunologique consiste en une immunodiffusion en gel d'agarose. Il est fait sur lame pour microscopie (7,5cm x 2,6 cm) à la température de la pièce (≃ 20°C) selon le procédé d'Ouchterlony (55). Le gel (tampon phosphate 10 mM, pH 7 ; 1 % en indubiose A37 - Industrie Biologique Française) d'épaisseur environ 2 mm est perforé de différents puits destinés à recevoir les échantillons.

L'antiserum de lapin (40 µl) est déposé dans un puit central (diamètre 5 mm) et les solutions enzymatiques (15 µl) sont placées dans six puits périphériques (diamètre 3 mm) équidistants de celui-ci (distance au centre : 9 mm). Une lame

permet de recevoir deux de ces hexagones (voir schéma ci-dessous)



Ab = antibody = serum

Une large gamme de concentration en antigènes est explorée. Chaque concentration est testée deux fois sur un même gel (dans deux puits consécutifs). Une lame permet donc de tester 6 concentrations. Chaque essai est doublé sur une autre lame, portant à quatre le nombre des dépôts pour chaque concentration de la gamme.

Après diffusion par dépôt de la plaque sur une surface horizontale sous une cloche en atmosphère humide à T° ambiante, les gels sont observés ; certains sont colorés.

C H A P I T R E I

ETUDE DES LOCI SENSIBLES A LA TRYPSINE ET DES DOMAINES GLOBULAIRES DANS LE H-FLAVOCYTOCHROME b_2.

Introduction

Par analogie avec le travail de Goldberg, nous définirons dans ce travail un domaine globulaire par le critère expérimental suivant : découpé par la trypsine dans la chaîne sous sa conformation "native", il résiste à une protéolyse ultérieure par cette protéase.

Cette définition peut être critiquée en ce sens qu'il serait nécessaire d'étudier aussi la résistance à d'autres protéases. Dans le premier temps que constitue cet exposé nous nous limiterons néanmoins aux effets d'une seule d'entre elles : la trypsine.

Pour étudier la structure du H-flavocytochrome b_2 en termes de "globules" et de "ponts sensibles" nous avons fait une série d'hydrolyses trypsiques dans des conditions variées. Seuls les résultats les plus significatifs seront rapportés ici. Le principe des expériences est de déterminer, au cours du temps, après mélange des solutions de flavocytochrome b_2 et de trypsine (dans des conditions déterminées mais variables de température, de pH, concentrations, tampons solvants), la cinétique de la réaction de protéolyse et les caractères des produits de cette réaction. A cette fin, des aliquotes prélevées à temps variables sont analysés :

1/ par électrophorèse en gel de polyacrylamide 0,1 % en S.D.S. selon la méthode originale de Shapiro (40) modifiée par Weber et Osborn (41). Grâce à un étalonnage pratiqué avec des protéines de poids moléculaire connu, on en déduira le poids moléculaire des fragments formant les différentes bandes observables sur les gels colorés. Par "densitométrie" et intégration des surfaces comprises sous les pics "densitométrés" on aura une mesure de la concentration de chaque fragment au cours de l'hydrolyse, concentration exprimée en unités arbitraires.

2/ par fluorométrie pour déterminer les quantités de flavine libérées par l'enzyme, selon (25).

3/ De plus, dans certains cas, l'activité enzymatique sera mesurée dans les conditions standard ou à concentrations variables de substrat et d'accepteur.

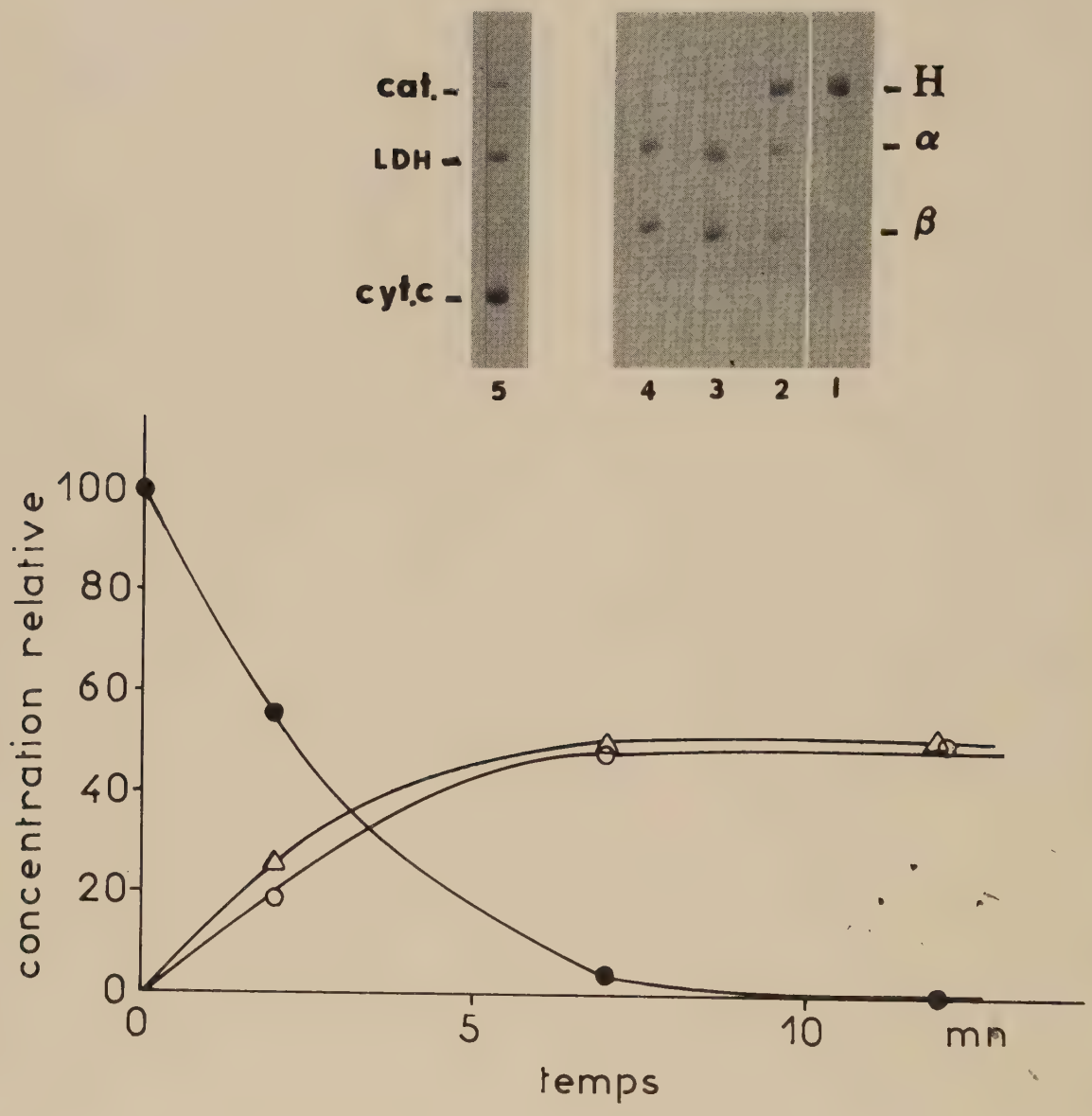


Figure n°3 : Hydrolyse trypsique du H-flavocytochrome b_2
tampon phosphate pH 7 ; 20°C ; b_2H=8,7mg/ml ;
trypsine=1mg/ml .
gels 1,2,3,4 : temps 0,2,7,12 mn; gel 5 : catalase, LDH ,cytochromec
La concentration relative d'un composant est représentée par l'aire du pic densitométré correspondant exprimée en pourcentage de l'aire totale densitométrée dans le gel qui le contient .

Résultats

Le H-flavocytochrome b_2, comme le montre le gel n°1 de la figure 3A, ne présente, lorsqu'il est pur qu'une seule bande en électrophorèse GPA, SDS, nommée "H", à laquelle correspond une mobilité $\bar{m} = 0,266$ et une masse moléculaire M = 58 200 daltons estimée selon la méthode standard décrite dans Matériel et Méthodes et Tableau I.

1 - Hydrolyse trypsique en tampon phosphate 0,1 M, pH 7 : coupure "a" (expérience n° 1)

Dans ces conditions, au fur et à mesure de la progression de la réaction protéolytique, on constate la disparition progressive du composant H ($\bar{m}_H = 0,294$ dans cette expérience) et l'apparition progressive et parallèle de deux nouvelles bandes en électrophorèse GPA, SDS de mobilités :

$$\bar{m}_\alpha = 0,445 \qquad \bar{m}_\beta = 0,654$$

Ces deux bandes sont pures et ne présentent pas de bandes parasites correspondant à des constituants de poids moléculaire significativement différents (voir gel n° 2,3,4 ; figure 3A). Au temps 7 mn, ne subsistent que 4 % de la bande H. Au temps 12 mn, seuls α et β sont présents à l'exclusion de toute autre bande.

Ces résultats ont été représentés sous une forme cinétique dans la figure 3B. On peut calculer les constantes apparentes du 1er ordre par la pente d'une représentation graphique du 1er ordre. Etant donné le faible nombre de points dans cette expérience la valeur trouvée n'a qu'un caractère d'estimation. On trouve k : 0,47 mn^{-1} pour la disparition de H. Des valeurs sensiblement voisines sont calculées pour l'apparition d' α et de β : $k = 0,37\ mn^{-1}$ et $k = 0,39\ mn^{-1}$.

Le plateau dans l'évolution de ces deux formes indique que leur vitesse de dégradation est inférieurs à 0,02 mn^{-1}. Cette valeur montre leur stabilité vis à vis de la trypsine.

Les masses moléculaires d'α et de β (respectivement 35 300 et 18 700 daltons Tableau I) montrent que ceux-ci constituent deux morceaux, en première approximation complémentaire résultant d'une coupure apparemment ponctuelle de la chaîne H en un point "a", situé aux deux tiers de celle-ci, selon la réaction

H	⟶	α	+	β
58 200		35 300		18 700
		$\sum$	=	54 000

Note additive sur la figure 3 : (• = H ; o = β; Δ = α)

Expérience n° 1 (paragraphe 1) p 25

	H	α	T	β	ε	η
$\bar{m}$	0,294	0,445	absent	0,654	absent	absent
nombre de gels	2	8		10		
σ	0,006	0,018		0,015		
k apparition		$0,37mn^{-1}$		$0,39mn^{-1}$		
k disparition	$0,47mn^{-1}$	$< 0,021mn^{-1}$		$< 0,021mn^{-1}$		

Expérience n° 2 (paragraphe 3a) p 27

	H	α	T	β	ε	η
$\bar{m}$	0,290	0,444	absent	0,656	0,733	absent
nombre de gels	2	8		8	2	
σ		0,019		0,022	0,007	
k apparition		$0,54mn^{-1}$		$0,53mn^{-1}$		
k disparition	$0,62mn^{-1}$	$0,003mn^{-1}$		$< 0,0009mn^{-1}$		

Expérience n° 3 (paragraphe 3, b) p 28

	H	α	T	β	ε	η
$\bar{m}$	0,235	0,407	0,558	0,627	0,698	0,808
nombre de gels	2	4	11	11	8	7
σ	0,015	0,015	0,024	0,024	0,026	0,019
Etalonnage interne	Log P.M. = - 2,83 x + 11,67					
Poids moléculaires	60200	37000	24100	19800	16200	11900
k apparition		$> 0,60\ mn^{-1}$		$> 0,60\ mn^{-1}$	$0,033mn^{-1}$	$0,023mn^{-1}$
k disparition	$> 0,60mn^{-1}$	$0,030mn^{-1}$		$0,0007mn^{-1}$	$< 0,001mn^{-1}$	$< 0,001mn^{-1}$

Tableau I (1ère partie)

Valeurs moyennes

	H	α	T	β	ε	η
$\bar{m}$	0,266	0,437	0,567	0,654	0,733	0,810
Nombre de gels	23	43		71	35	24
Poids moléculaires	58200	35300	24100	18700	14800	12200
Etalonnage	Log P.M. = - 2,93 x + 11,75					

Perte de flavine	$k_{app} = 3 . \quad 10^{-4}\ mn^{-1}$
Perte d'activité	$k_{1\ app} = 0,55\ mn^{-1}$
	$k_{2\ app} = 22 \pm 5\ 10^{-4}\ mn^{-1}$

Tableau I (suite)

Hydrolyse trypsique du H-flavocytochrome b_2 :

- Identification électrophorétique des produits d'hydrolyse.
- Détermination des constantes de vitesse apparentes du 1er ordre d'apparition et de disparition des différents produits.
- Relation entre trypsinolyse, perte de flavine et perte d'activité du H-flavocytochrome b_2
  (voir commentaires dans le texte).

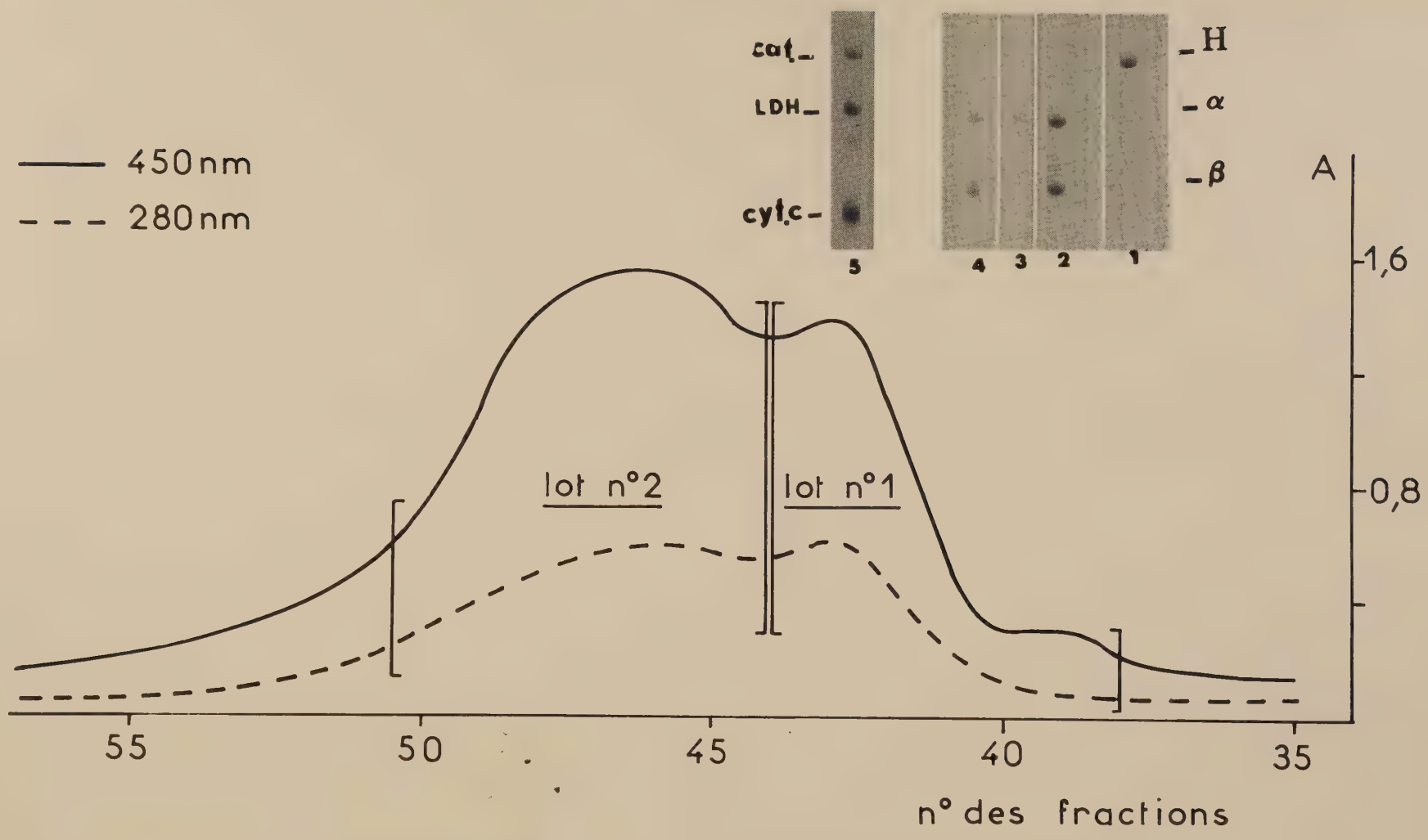


Figure n°4 : Diagramme d'élution du H-flavocytochrome b_2 coupé en α-β
Hydrolyse 50sec. E.P.E.pH 8, 20°C, b_2H = 3,5 mg/ml, T = 0,6 mg/ml
Elution sephadex G75 : Tris 150 mM, Lactate 50 mM, PMSF 1 mM, Guanidine HCl 1 M, mercaptoéthanol 0,1 M, EDTA 20 µM, pH 6,3 .
Gel 1 : b_2H initial, gel 2 : b_2H coupé (dépôt), gel 3 : lot 1, gel 4 : lot 2, gel 5 : étalonnage .

La dénomination de α et de β leur a été donnée en raison de leurs similarités de poids moléculaires avec celles trouvées dans la forme "clivée" du flavocytochrome b_2 de Saccharomyces cerevisiae.

Il était intéressant de tester si cette ressemblance était significative. Dans le S flavocytochrome b_2 le fragment α porte l'hème. Nous avons cherché à montrer qu'il en était de même pour le H-flavocytochrome b_2. Cette étude est décrite dans l'expérience suivante.

2 - Trypsinolyse ménagée du H-flavocytochrome b_2 : Séparation préparative des produits α et β résultant de la coupure au locus "a".

Nous avons choisi de tenter de séparer en milieu dissociant peu dénaturant les chaines α et β du H-flavocytochrome b_2 coupé par protéolyse ménagée. Le critère de non dénaturation choisi fut la conservation du site de fixation de l'hème. Des expériences préliminaires d'ultracentrifugation du H-flavocytochrome b_2 coupé en α et β semblaient montrer que la dissociation de ces chaînes pouvait être obtenue en guanidine HCl 1 M. Nous avons donc essayé de séparer α et β sur colonne de Séphadex dans ces conditions.

Des trois expériences qui ont été faites, une seule a abouti à la résolution partielle des deux espèces α et β . Dans cette expérience la colonne était équilibrée en un tampon contenant le substrat du H-flavocytochrome b_2 : le L-lactate. Le détail des conditions expérimentales est décrit dans "Matériel et Méthodes".

Après protéolyse, une analyse électrophorétique de l'hydrolysat a montré que la bande H avait effectivement totalement disparu. Cette disparition est correllée à l'apparition de deux bandes de mobilités : $\bar{m}$: 0,445 et $\bar{m}$ = 0,66 correspondant effectivement aux fragments α et β . L'hydrolysat a été concentré par précipitation à 75 % de saturation en sulfate d'ammonium. Le culot dissout a été déposé sur une colonne de Séphadex G-75. Le surnageant ne contenait pas d'hème ni de flavine. Après élution nous avons obtenu l'élugramme présenté sur la figure n°4. Les conditions utilisées pour la filtration moléculaire étant fort peu résolutives nous avons tout simplement regroupé les fractions en deux lots, le premier correspondant aux fractions éluées en tête de colonne, le second aux fractions suivantes (voir élugramme, Figure 4). Les fractions de queues n'ont pas été testées. Chacun de ces lots peut correspondre à un mélange d'espèces moléculaires si la dissociation en monomères de α et de β n'est pas complète. Rappelons en effet qu'avec le S-flavocytochrome b_2 coupé en α et β, on trouve encore des espèces α-α dimères en guanidine HCl 3 M.

Chaque lot est renaturé en présence d'un excès de FMN et est analysé après précipitation au sulfate d'ammonium et passage sur un Séphadex G-25 pour éliminer l'excès de flavine. Les résultats de cette analyse sont portés dans le tableau II.

Tableau II

Fractionnement du mélange α + β après trypsinolyse ménagée : Distribution de l'hème et de la flavine :

	Fractions renaturées		
	lot n° 1	lot n° 2	
Electrophorèse GPA, SDS	1 bande unique $\bar{m}$ = 0,43 , (0,021)	2 bandes $\bar{m}$ = 0,42	$\bar{m}$ = 0,65
Etalonnage interne y = - 2,93 x + 11,77	P.M. = 36 700	P.M. = 35 100	P.M. = 19 300
Etalonnage standard y = - 2,93 x + 11,75	P.M. = 36 000	P.M. = 34 400	P.M. = 18 900
Identification	α	α	β

Après renaturation en présence de FMN en excès (puis précipitation à 85 % sulfate d'ammonium et centrifugation et lavage du culot dans un tampon 85 % en sulfate d'ammonium, recentrifugation) le culot est redissous dans un minimum de tampon et passé sur un colonne de Séphadex G-25 pour éliminer l'excès de falvine non fixée, on dose le FMN fixé et le FMN total contenu dans chaque lot.

$\frac{\text{Tryptophane}}{\text{Hème}}$	b) 7 à 8	
$\frac{\text{FMN fixée}}{\text{Hème}}$	c) 2,4 % à 4,4 %	33 à 38 %

b) Le rappot Trp/H = 7-8 supérieur à celui pour le H-flavocytochrome b_2 H entier (Trp/H= 5 à 6). (voir chapitre II) peut s'expliquer par une légère perte d'hème au cours du traitement en guanidine 1 M. D'autres expériences, non décrites dans ce travail ont en effet montré que le site de l'hème était plus fragile dans le H-flavocytochrome b_2 que dans le S-flavocytochrome b_2.

c) Le 1er chiffre indique, la valeur maximale fixée après dilution dans la cuve de mesure de l'échantillon testé. Le second chiffre indique la valeur maximale de FMN fixé obtenue en supposant que toute la flavine contenue dans cet échantillon était fixée avant dilution dans la cuve de mesure.

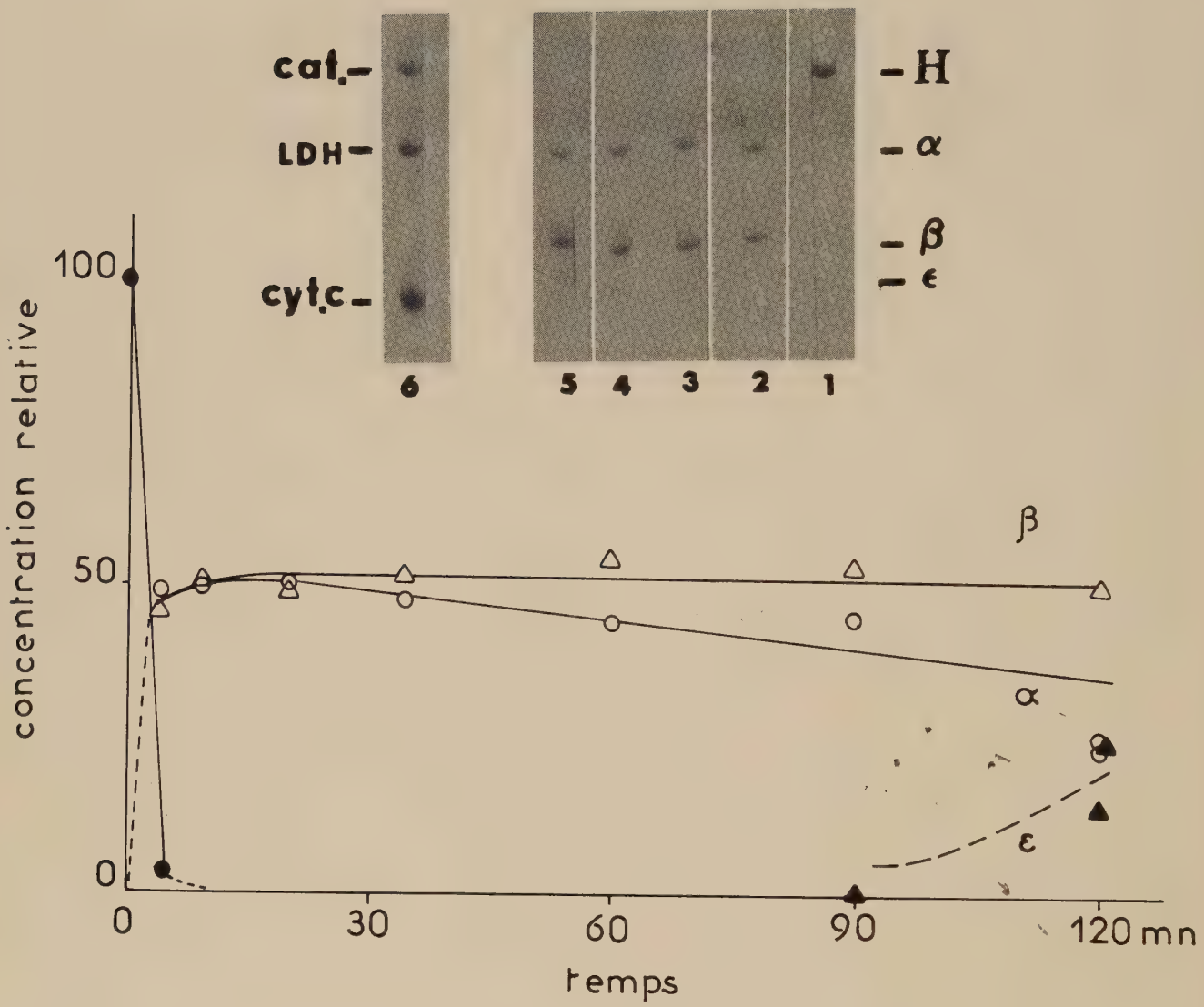


Figure n°5 : Evolution des différents produits lors d'une hydrolyse trypsique du H-flavocytochrome b2

tampon L.P.E. pH 7 ; 20,5°C ;

H-flavocytochrome b_2 7,9 mg/ml ; trypsine 1 mg/ml

gels 1,2,3,4,5 : temps 0,20,35,90,120 mn ; gel 6 : étalonnage .

La chromatographie en guanidine 1 M n'a pas permis, dans les conditions de l'expérience d'isoler les chaines β pures. Par contre, ainsi qu'en témoignent les contrôles électrophorétiques, nous avons isolé d'une part des chaines α d'autre part un mélange de chaines α et β.

Dans le lot n°1 nous trouvons 20 % de l'hème présent au départ, un seul constituant protéique, α, et un rapport Trp/Hème voisine de 7. Cette valeur est compatible avec la valeur Trp/Hème = 4 trouvée pour la chaîne α du S-flavocytochrome b_2. On peut donc affirmer que la stoechiométrie α/H est voisine de 1 et que l'hème est bien porté par la chaîne α. De plus la quantité de flavine fixée après renaturation est insignifiante. Elle peut correspondre à une faible contamination par β (non détectée en électrophorèse GPA, SDS) donnant des espèces αβ capables de refixer la flavine.

Le lot n°2 qui contient des chaînes α (40 % de l'hème initial) et des chaînes β fixe le FMN : environ 33-38 % de FMN fixé par hème. Dans ce mélange α + β, il y a eu réassociation de α et β en espèces stables probablement de type $(\alpha\beta)_4$. La valeur élevée de 33-38 % met en évidence que l'association (avec l'hème) permet la refixation de la flavine. On sait que la refixation du FMN est toujours incomplète, voisine de 50 % comme cela a été souligné dans des expériences voisines faites sur le S-flavocytochrome b_2 par Ninio et coll. (31).

Après avoir donc montré que α portait effectivement l'hème, nous avons étudié la possibilité de fragmenter α et β en espèces moléculaires plus petites mais stables, de propriétés globulaires .

3 - Evolution de la trypsinolyse du H-flavocytochrome b_2 après la coupure au locus "a" : Etude des coupures "c" et "d".

a) Expérience n°2

Pensant qu'il serait bon de protéger le site actif de l'enzyme lors de l'hydrolyse nous avons effectué celle-ci en présence du substrat : le L(+)lactate. Cette hydrolyse a été suivie plus longtemps.

La coupure H $\longrightarrow \alpha + \beta$ clairement mise en évidence sur la figure 5 se fait avec une constante de vitesse $k_{app} = 0{,}62\ mn^{-1}$. Les produits α et β sont indistinguables, par leurs mobilités en électrophorèse GPA, SDS, de ceux caractérisés dans l'expérience précédente ($\bar{m}_\alpha = 0{,}444$ $\bar{m}_\beta = 0{,}656$). Au temps 5 mn, 4,5 % du monomère demeurent; au temps 10 mn, tout le monomère a disparu. On constate que β, une fois formé présente une stabilité considérable. Sa vitesse de dégradation est trouvée inférieure à $0{,}0009\ mn^{-1}$ (voir tableau I et figure 5).

Le fragment α , quoiqu'assez stable, disparait partiellement ; en même temps apparait une nouvelle bande ε de mobilité $\bar{m}_\varepsilon = 0{,}733$, correspondant à un fragment de poids moléculaire 14 700 qui ne peut provenir que de α . La réaction de coupure de α sera mieux caractérisée dans l'expérience suivante. Ici encore les bandes α, β, ε paraissent monodisperses, il n'y a donc pas

Figure n°6 : Hydrolyse du H-flavocytochrome b_2 par la trypsine
(tampon L.P.E, 20°C, pH 7, b_2H = 4,3mg/ml, trypsine=2mg/ml)

Au cours de l'hydrolyse, onze aliquotes ont été prélevés et testés simultanément en electrophorèse GPA, SDS . Un étalonnage avec des protéines de poids moléculaire connu a été effectué parallèlement . Chaque point a été doublé . Sur les 24 gels, 3 se sont trouvés détériorés au cours du démoulage, devenant inexploitables . Nous avons donc disposé de 19 points et de 2 étalonnages pour cette expérience . Un témoin comportant la trypsine seule a été réalisé ultérieurement mais dans des conditions semblables à celles-ci ; ce témoin est montré sur le gel n°10 .

Quantité de trypsine déposée sur chaque gel dans l'échantillon flavocytochrome b_2 + trypsine : 6,9 µg

Quantité de trypsine déposée sur le gel témoin sans flavocytochrome b_2 : 5 µg

gels 1 à 9 : aliquotes de l'hydrolysat aux temps : 1=0mn ; 2=10 mn ; 3=15 mn; 4=20 mn; 5=50 mn; 6=80 mn; 7=120 mn; 8=180 mn; 9=240 mn .

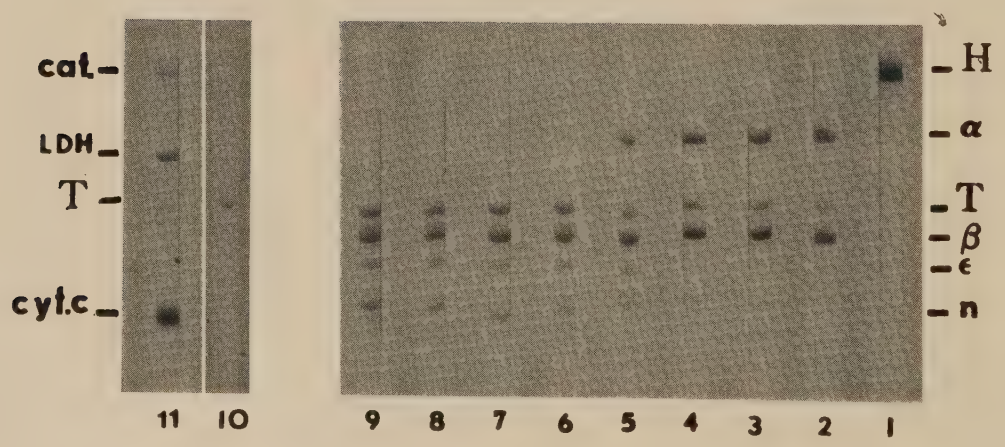
gel n°10 : témoin trypsique

gel n°11 : gamme d'étalonnage : catalase=60 000 d, L.D.H.=36 000 d, cytochrome c=11 750 d . (La phosphorylase n'est pas représentée sur la photo .)

bande H : monomère de H-flavocytochrome b_2

bande T : Trypsine

bandes α , β , ε et n : produits de dégradation du H-flavocytochrome b_2



d'espèces moléculaires de masses significativement différentes, eu égard au pouvoir résolutif de la méthode (voir photo des gels Figure 5A),

b) Expérience n°3 à plus forte concentration trypsique.

Pour étudier la stabilité de α et de ε vis à vis de la trypsine nous avons changé les conditions d'hydrolyse en augmentant deux fois la concentration trypsique et diminuant deux fois la concentration du H-flavocytochrome b_2. Si la réaction était limitée par un processus de collision bimoléculaire on retrouverait la même vitesse résultante. Ce point n'est pas l'objet de notre propos.

Cette protéolyse a été étudiée à l'aide de 24 échantillons prélevés en cours d'hydrolyse pendant 240 minutes et analysés comme précédemment (Fig.6). La trypsine, présente à plus forte concentration relative est détectable sur les gels après électrophorèse GPA, SDS. Un témoin, (gel n° 10) comportant seulement la trypsine permet de caractériser cette bande pas sa mobilité $m_{TR} = 0,567$.

Dans cette expérience, probablement en raison d'une réticulation différente des gels, les mobilités trouvées pour toutes les bandes étaient différentes des mobilités moyennes dans les autres expériences. Comme un étalonnage avec 4 protéines étalons a été fait avec les mêmes gels dans la même série expérimentale , nous avons pu établir une droite de régression d'équation $\text{Ln P.M.} = -2,83x + 11,67$ utilisée pour le calcul correct des poids moléculaires. Ceux-ci sont donnés dans le Tableau I.

Dans les conditions d'hydrolyse utilisées ici, la chaîne initiale H est coupée en α et β avant le début de l'observation (moins de 10 mn). Le fragment β ne décroit en concentration que de 15 % en 240 mn. Sa vitesse d'hydrolyse apparente $k_{app} = 7 \pm 4\ 10^{-4}\ mn^{-1}$ est calculée sans corriger de la concentration différente en trypsine, en prenant simplement la pente de la droite de représentation du 1er ordre.

Le fragment α, lui, a déjà partiellement disparu lors du début de l'observation avec un $k_{app} = 0,030\ min^{-1}$. Sa disparition, tandis que β est stable, est corrélée avec l'apparition simultanée de ε déjà décelée dans l'expérience précédente et de n ($\bar{m} = 0,810$, $M = 12\ 200$) qui est le noyau cytochromique b_2.

Les stabilités de n et de ε sont très grandes. En 100 mn leur disparition n'est pas détectable, leur k_{app} de dégradation est inférieur à $0,001\ mn^{-1}$ (probablement très inférieur).

On peut donc écrire le schéma de dégradation de α (schéma qui sera discuté plus loin).

$$\underset{35\ 300}{\alpha} \longrightarrow \underset{14\ 800}{\varepsilon} + \underset{12\ 200}{\eta} + \underset{\text{(peptides)}}{\psi}$$

$$\sum_{\varepsilon + \eta} = 27\ 000$$

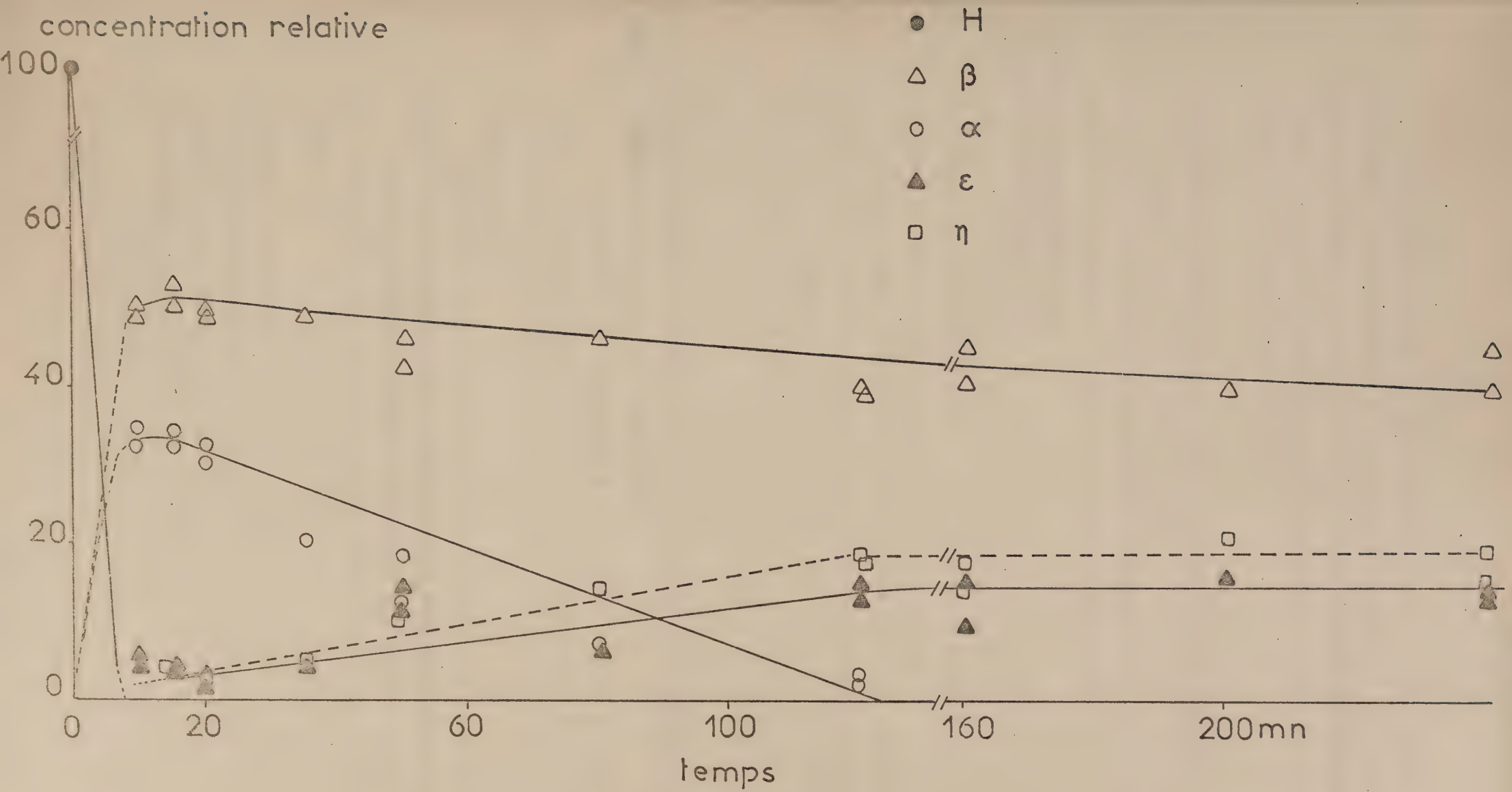


Figure 7 : Hydrolyse trypsique du H-flavocytochrome b_2

Evolution du monomère et de ses dérivés en fonction du temps.

b_2H : 4,3 mg/ml ; trypsine 2 mg/ml ; L.P.E. pH 7,0 ; 20°C

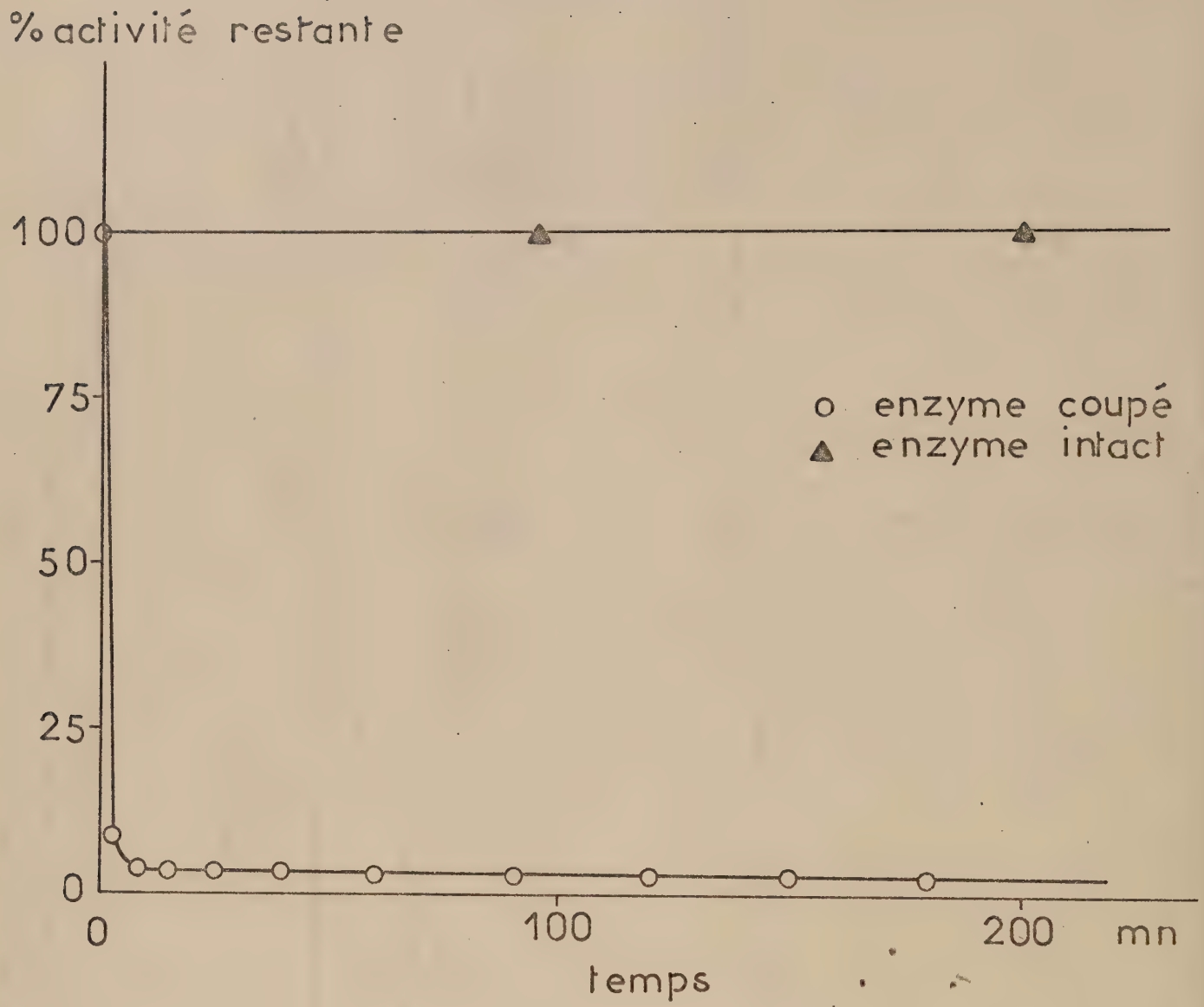


Figure 8 : Hydrolyse trypsique du H-flavocytochrome b_2 : Perte de l'activité en fonction du temps.

H-flavocytochrome b_2 : 4,3 mg/ml

Trypsine 2 mg/ml ; L.P.E. pH 7 ; 20°C

Les relations de poids moléculaires entre α et ε+η montrent que des peptides, non détectés sur le gel ont été formés dans la réaction. Ils représentent une masse globale d'environ 7 500 daltons soit ≃ 65 résidus d'acides aminés. Les résultats de cette troisième expérience ont été reportés dans le Tableau I, et les figures 6 et 7.

Corrélation entre hydrolyse, activité enzymatique et perte de flavine prosthétique

En même temps que l'étude cinétique de la trypsinolyse du H-flavocytochrome b_2 nous avons suivi la perte d'activité de celui-ci et la libération du coenzyme flavinique en fonction du temps de protéolyse.

- Activité (Figure 8) :

Un témoin montre que le flavocytochrome b_2 ne perd aucune activité quand il est conservé sans trypsine dans les conditions expérimentales de l'hydrolyse.

Pour le H-flavocytochrome b_2 en présence de trypsine la situation est très différente. La courbe montre deux phases très nettes :

1) une première phase très rapide (moins de 10 mn) correspond à la perte de 96 % de l'activité enzymatique (passage d'une activité moléculaire apparente de 1 000 s^{-1} à 38,5 s^{-1} à 30°C) $k \simeq 0{,}55\ mn^{-1}$. Cette phase aboutit à un pseudo plateau significativement différent de zéro correspondant à la seconde phase.

2) La seconde phase très lente correspond à une faible perte d'activité : passage d'une activité moléculaire apparente de 38,5 s^{-1} à 25,7 s^{-1} au temps t = 180 mn (soit de 4 % à 2,5 % de l'activité initiale) ($k_{apparent} = 22 \pm 5\ 10^{-4} mn^{-1}$)

- Libération du coenzyme flavinique :

Les mesures de fluorescence de la flavine libérée (Figure 9) indiquent que cette libération est très lente dès l'origine, linéaire en fonction du temps, avec une constante apparente de vitesse de $3.10^{-4} mn^{-1}$ (connue avec beaucoup de précision)

- Trypsinolyse :

Pendant la première phase de perte d'activité se produit la coupure du monomère H sans perte de matériel protéique (en première approximation).

Pendant la seconde phase de perte d'activité se produisent deux phénomènes : la coupure de α en ε et η ($k_{apparent}$ $300.10^{-4} mn^{-1}$) et la dégradation de β ($k_{apparent} \simeq 7\ 10^{-4}\ mn^{-1}$).

Remarque : La concentration de β peut être sous estimée si l'hydrolyse trypsique évolue quelque peu pendant la dénaturation avec SDS précédent le dépôt sur gel, possibilité qui a été démontrée dans d'autres cas par J.R. Pringle (56). Cette sous estimation peut conduire à une surestimation de la vitesse de dégradation de β

La corrélation entre les trois phénomènes : coupure de H en (αβ), perte d'activité et perte de flavine sera discutée à la fin de ce chapitre (paragraphe 6 p. 37).

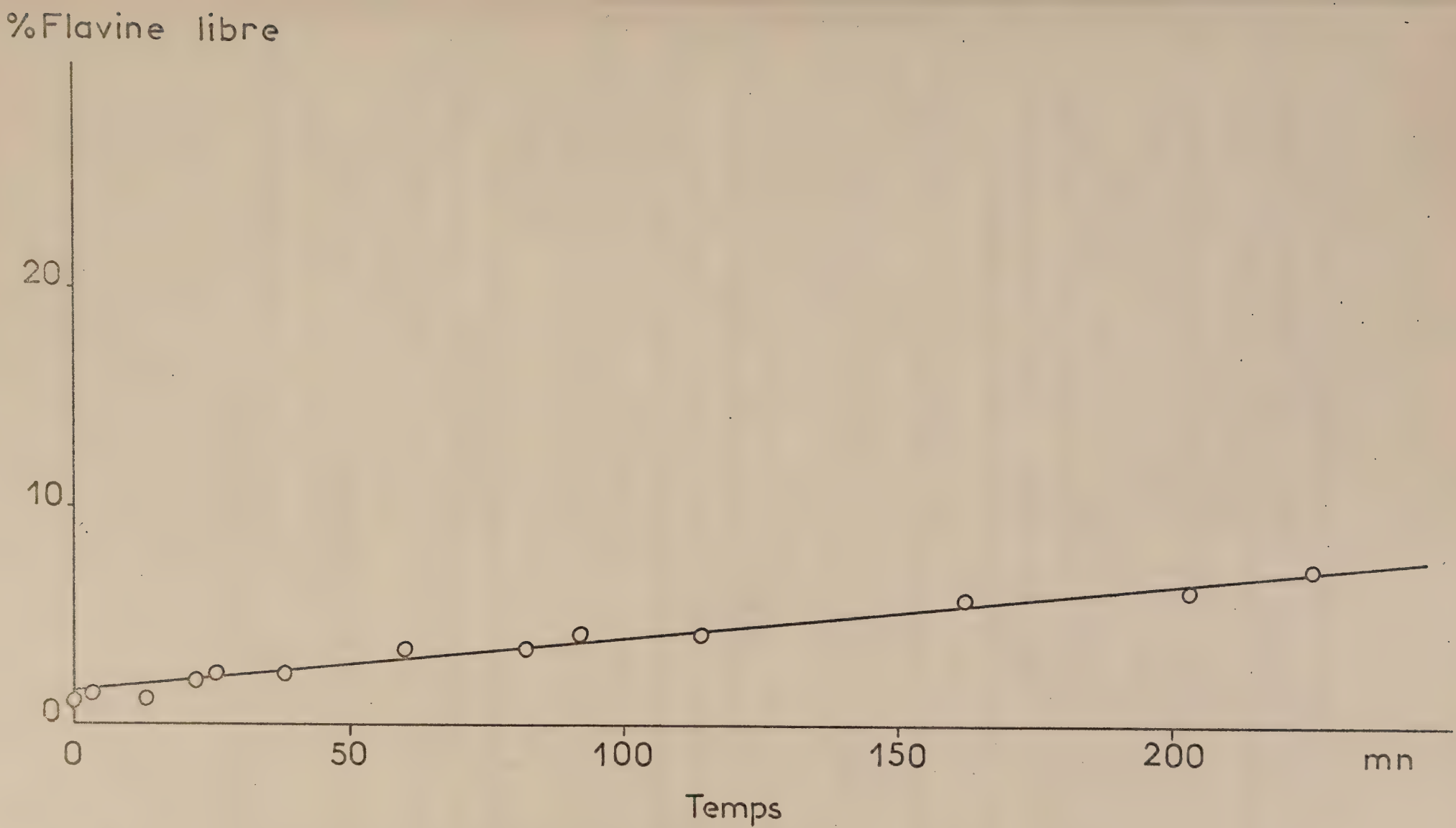


Figure 9 : Hydrolyse trypsique du H-flavocytochrome b_2

Libération du coenzyme flavinique en fonction du temps.

(b_2H = 4,3 mg/ml ; Trypsine 2 mg/ml ; L.P.E. pH 7,0 20°C)

	K_M L-lactate	V_{max} L-lactate	V_{max} ferricyanure	K_M ferricyanure
b_2 H intact	0,86 mM	503 s^{-1}	500 s^{-1}	85 µM
	$y = 1,72.10^{-3}x + 1,99.10^{-3}$ r = 0,998 (Figure n° 10)		$y = 0,17.10^{-3}x + 2,00.10^{-3}$ r = 0,937 (Figure n° 12)	
	droite de régression		droite de répression	
b_2 H coupé en $(\alpha\beta)_4$ exp. n°1	1,15 mM	71 s^{-1}	68 s^{-1}	98 µM
	$y = 16,2\ 10^{-3}\ x + 14,1.10^{-3}$ r = 0,992 (Figure n° 11)		$y = 1,44.10^{-3}x + 14,67.10^{-3}$ r = 0,934 (Figure n° 13)	
b_2 H coupé en $(\alpha\beta)_4$ exp. n°2	0,84	60,4 s^{-1}	67 s^{-1}	103 µM
	$y = 13,83.10^{-3}\ x + 16,55\ 10^{-3}$ r = 0,995		$y = 1,54.10^{-3}x + 15.10^{-3}$ r = 0,975	
	non représentés			

Tableau III

Détermination des paramètres cinétiques K_m et V_m du H-flavocytochrome b_2 intact et du H-flavocytochrome b_2 coupé en $(\alpha\beta)$ à 15°C.

Pour pouvoir interpréter les caractères de la réaction flavocytochrome b_2 intact ——→ flavocytochrome b_2 coupé, il était indispensable de savoir à quel paramètre cinétique (K_m ou V_m) était due la perte d'activité observée.

4 - Paramètres cinétiques du H-flavocytochrome b_2 coupé en $\alpha + \beta$

Une solution de flavocytochrome b_2 est divisée en 2 parties.

- L'une est additionnée de trypsine et hydrolysée dans les conditions prévues pour donner uniquement une coupure du monomère H en ($\alpha\beta$).(Hydrolyse de 7 mn,L.P.E. pH 7,0 ;(b_2H)=4,5 mg/ml;Trypsine : 2mg/ml ;20°C)

La protéolyse est arrêtée par addition de l'inhibiteur trypsique du soja et par mise à 0°C. Une vérification par électrophorèse GPA, SDS confirme que la réaction H $\rightarrow \alpha + \beta$ est totale. Par contre α avait commencé à se couper en ε et η.

- L'autre est conservée dans les mêmes conditions sans trypsine.

Leurs activités sont mesurées à concentrations variables de L(+) lactate et de ferricyanure.

Les courbes obtenues en fonction du substrat avec la représentation de Lineweaver et Burk sont présentées sur les Figures 10 et 11 .

Notons que la non linéarité vers les hautes concentrations de lactate pour le flavocytochrome b_2 intact est due à un phénomène déjà décrit (Baudras et Spyridakis (43)) d'inhibition par excès de substrat.

En ne considérant que les points de la région linéaire, on a calculé les droites de régression donnant les valeurs de K_m et V_m portées dans le Tableau III.

Pour les expériences à concentration de ferricyanure variable, à L-lactate saturant (10 mM) Figure (12et 13), en raison du faible $\Delta\varepsilon$ (1,04 $mM^{-1}cm^{-1}$) du ferricyanure à 420 nm nous avons peu de précision sur les mesures faites à faible concentration de cet accepteur.

Les valeurs de K_m et V_m calculées par la droite de régression linéaire pour l'enzyme intact et pour l'enzyme coupé sont également portées dans le Tableau III.

La comparaison des paramètres cinétiques du H-flavocytochrome b_2 intact et coupé en $\alpha + \beta$ montre une considérable diminution de la vitesse maximale corrélée à la coupure (500 sec^{-1} à 70 sec^{-1} à 15°C) La constante de Michaelis pour le L-lactate n'est pas modifiée de façon significative, pas plus que ne l'est le K_M apparent pour le ferricyanure. Ces résultats seront discutés et interprétés plus loin.

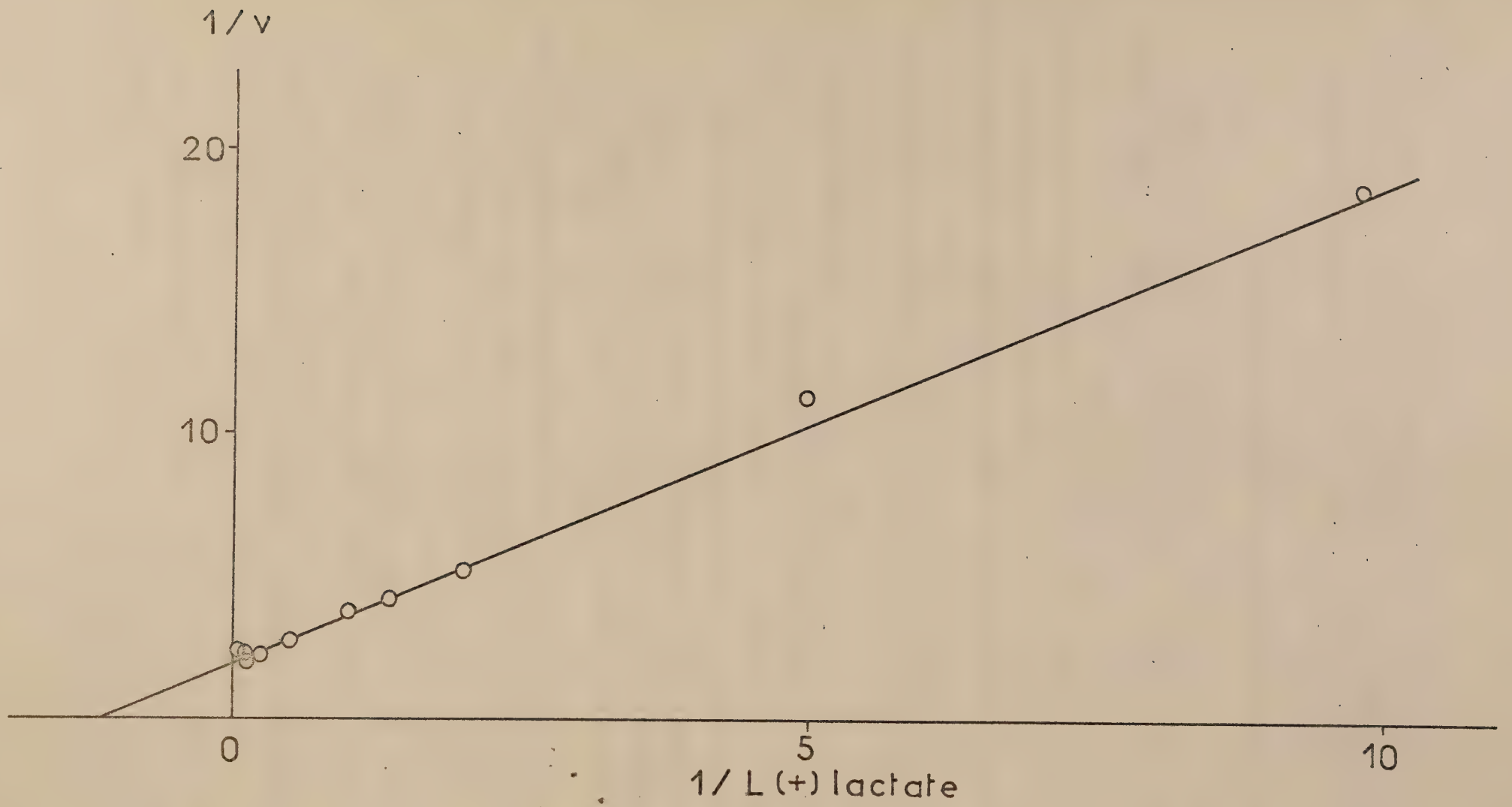


Figure 10 : Détermination des paramètres cinétiques V_m et K_m (L(+)lactate) pour le H-flavocytochrome b_2
Représentation de Lineweaver et Burk.
(v est exprimée en électrons équivalents transférés par mole d'hème par seconde à 15°C)
(b_2H) = 0,026 µM). Ferricyanure : 1,2 mM

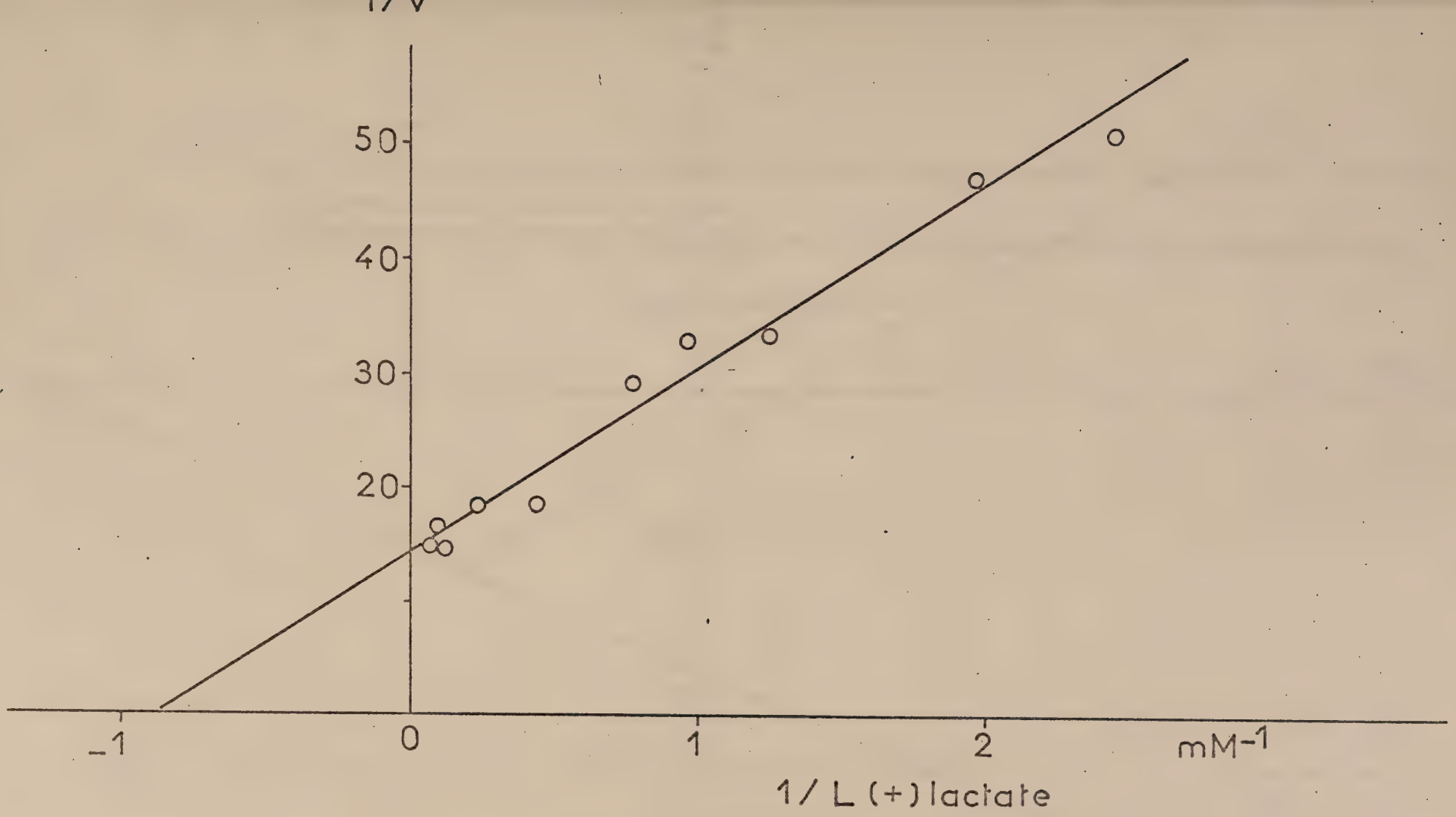


Figure 11 : Détermination des paramètres cinétiques V_m et K_m (L(+)lactate) pour le H-flavocytochrome b_2 coupé en (α, β) par la trypsine.

Représentation de Lineweaver et Burk.

(v est exprimée en électrons équivalents transférés par mole d'hème et par seconde à 15°C).

(b_2H) = 0,143 µM Ferricyanure : 1,2 mM

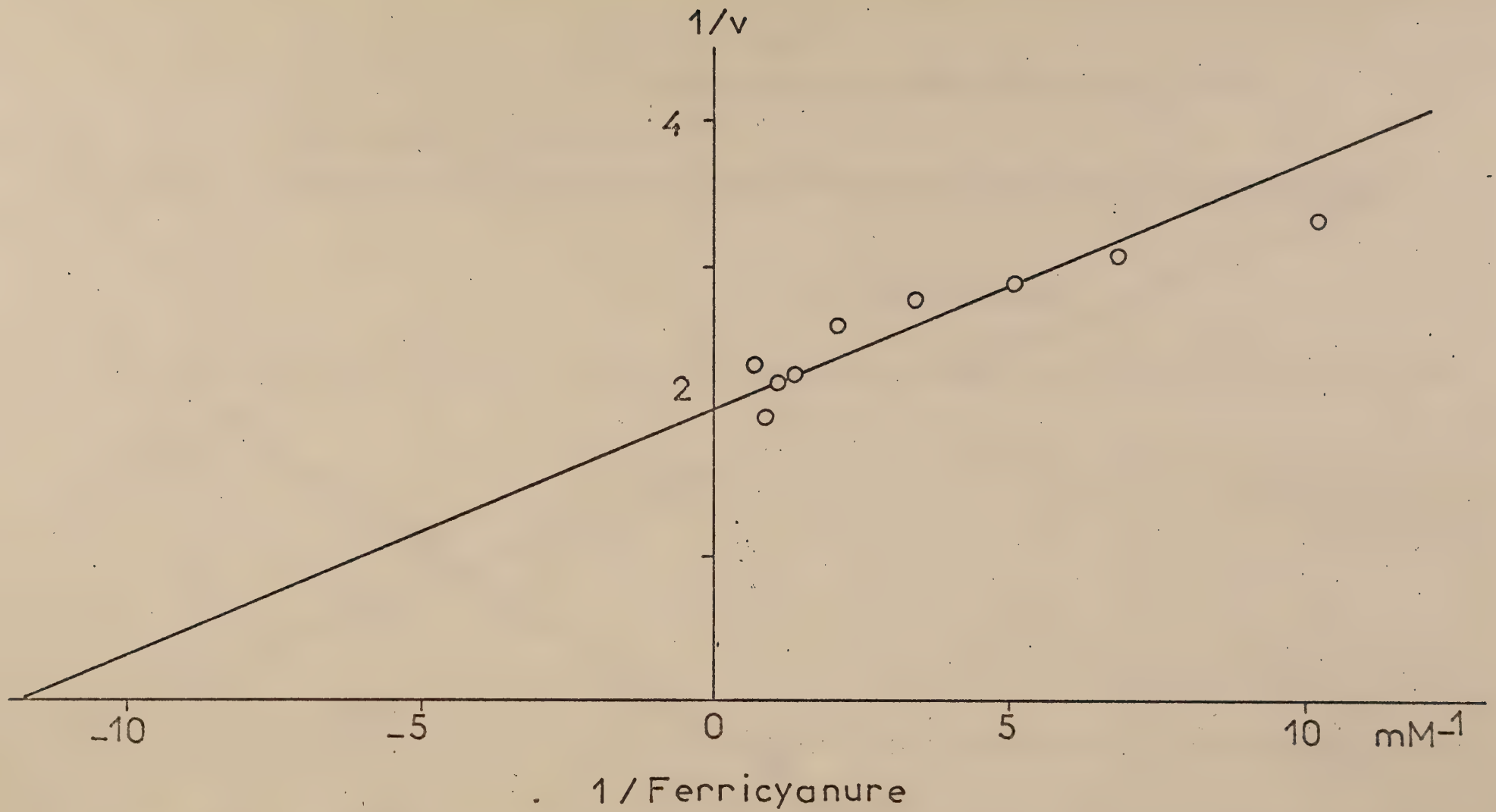


Figure 12 : Détermination des paramètres cinétiques V_m et K_m (ferricyanure) pour le H-flavocytochrome b_2.
Représentation de Lineweaver et Burk.
(v est exprimée en électrons équivalents transférés par mole d'hème par seconde - 15°C) ; (b_2H) = 0,026 µM).
L(+)lactate : 10 mM

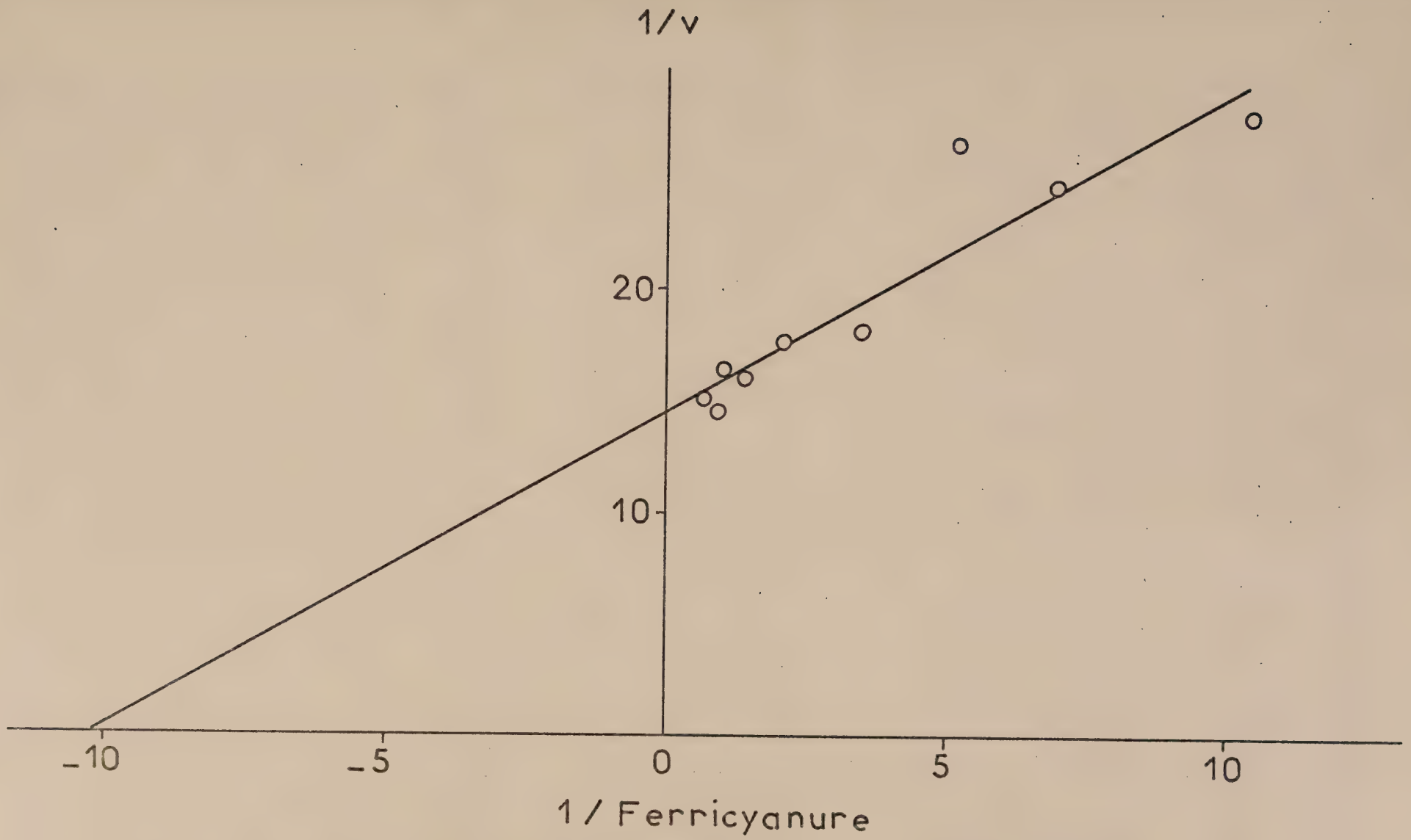


Figure 13 : Détermination des paramètres cinétiques V_m et K_m (Ferricyanure) pour le H-flavocytochrome b_2 coupé en α, β par la trypsine.

Représentation de Lineweaver et Burk.

(v est exprimée en électrons équivalents transférés par mole d'hème par seconde à 15°C) (b_2H) = 0,143 µM).

L(+)lactate : 10 mM

5 - Etat de polymérisation du flavocytochrome b_2 coupé en $\alpha + \beta$.

Le même échantillon coupé par la trypsine en $\alpha + \beta$ a été testé par ultracentrifugation analytique par la méthode d'absorption lumineuse et par le procédé Schlieren (comme décrit dans Matériel et Méthodes). Les résultats suivants ont été obtenus :

	(b_2H)	$S_{4°} = S°_{4°C}$	$S_{6°}$	$S°_{6°}$	$S°_{20,w}$
Absorption	0,26 mg/ml	4,57 S			8,1 S
Schlieren	4,9 mg/ml		4,34 S	4,68 S	8,1 S

Tableau IV

Le coefficient de sédimentation trouvé par les deux méthodes pour le flavocytochrome b_2 coupé en α et β est tout à fait compatible avec celui trouvé par Baudras et Spyridakis (44) pour le tétramère non coupé ($S°_4$ = 5,7 Svedberg $S_{20,w}$ = 10,1 S). On peut donc assurer que la coupure qui affecte fortement l'activité de l'enzyme n'en affecte pas sa structure quaternaire. La perte d'activité que nous avons observée parallèlement à la coupure α,β n'est donc pas due à une dissociation de l'enzyme en monomères.

6) Problème des colorations spécifiques après électrophorèse GPA,SDS des bandes protéiques correspondant aux différents produits d'hydrolyse α , β , ε et η .

Il est important de noter tout d'abord que dans les expériences présentées la coloration totale de chaque gel, c'est à dire la somme des aires comprises sous chaque pic du tracé densitométrique est variable d'un gel à l'autre dans une même série expérimentale, mais ne subit pas de décroissance significative pendant les protéolyses étudiées. Ceci indique qu'il n'y a pas de perte de coloration pendant cette protéolyse donc que la capacité de chaque fragment de fixer le colorant ne dépend pas, en première approximation de l'intégration covalente de ce fragment au sein de la chaîne polypeptidique. Ce résultat est en accord avec ce qu'avait montré Naslin et coll. pour l'hydrolyse trypsique du S-flavocytochrome b_2. Ceci indique aussi que la perte de fragments sous forme de peptides non colorables ou diffusant hors du gel est relativement faible.

Il est évident néanmoins que la méthode d'évaluation des concentrations utilisée ici n'est pas très précise. Les duplicata indiquent la reproductibilité des évaluations. Nous avons été amenés à penser en particulier (expérience n°2) que lorsqu'une faible quantité d'un fragment fixant peu le colorant (n en l'occurence) était formée, la coloration qu'il prenait se confondait avec le bruit de fond de la densitométrie du gel.

Le tableau V montre la quantité de colorant fixée par chaque fragment de la chaîne H dans ces trois expériences. Pour évaluer ces quantités nous avons choisi les valeurs correspondant aux pourcentages maxima pour les fragments disparaissant (α et β) et les valeurs au plateau pour les fragments ne se dégradant plus (ε et η) en supposant que ces valeurs représentent 100 % du fragment considéré. Les efficacités de coloration sont exprimées en pourcentage par mole d'une part, par gramme d'autre part, en unités arbitraires. (On suppose qu'il y a linéarité entre le noircissement du positif polaroid et la coloration).

	H	α	β	ε	η	
Coloration par mole	100 %	51,5 %	48,5 %			exp 1 t = 7 mn exp 2 t = 5 mn
	100 %	déjà dégradé	50,7 %	14 %	18 %	exp 3 (máxima)
Coloration par gramme x 10^3	1,7	1,4	2,6	0,9	1,5	3 expériences

Tableau V

Les valeurs absolues de ces mesures ne sont pas connue avec précision. Les différences entre elles sont cependant significatives.

Notons au passage que β semble se colorer (coloration par mole) 3,7 fois plus que ε . Bien qu'il n'ait été établi qu'à partir d'une seule expérience, nous nous servirons de ce rapport ultérieurement. Sa valeur précise demande une confirmation.

Les colorations par gramme, données à titre indicatif confirment que chaque entité protéique diffère par sa capacité à fixer la coloration.

DISCUSSION DU CHAPITRE I :

1 - Sur la structure du monomère

En comparant le poids moléculaire du monomère H (58 200 daltons) à celui représenté par la somme α + β(35 300 + 18 700 = 54 000 daltons) nous constatons un déficit d'environ 4 000 daltons, soit une trentaine de résidus d'acides aminés.

On peut d'abord se demander si ce déficit est significatif. Notons qu'il apparait positivement dans toutes les expériences faites. Notons aussi que sa grandeur précise dépend un peu de la droite d'étalonnage utilisée pour la détermination des poids moléculaires, par contre la différence entre la masse moléculaire de H et la somme de celles d'α et de β se retrouve quelle que soit la droite d'étalonnage.

On peut énoncer, schématiquement deux modes d'obtention possibles pour α et β :

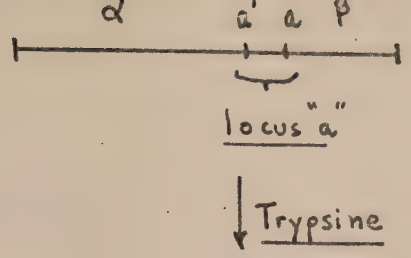
a) La coupure au "locus a" peut être une coupure ponctuelle.

Dans ce cas le déficit de 4 000 daltons serait imputé à l'existence à l'extrémité N terminale de la chaîne polypeptidique intacte, ou à son extrémité C terminale (ou aux deux) d'un ou de deux autres loci d'action de la trypsine. On peut imaginer que dans ce cas la (ou les) coupure(s) en ces points se feraient avant ou en même temps que la coupure au "locus a". S'il en était autrement, c'est à dire si la coupure au "locus a" précédait la coupure (ou les coupures) aux extrémités, nous devrions retrouver en électrophorèse des fragments "α long" ou (et) "β long" non encore coupés en α et β . Or il n'en est rien.

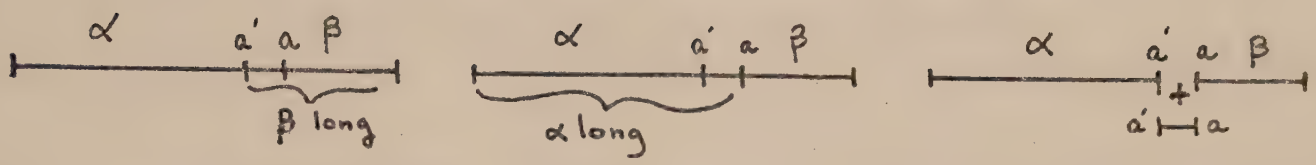
b) La coupure au "locus a" est multiple (double par exemple).

Dans ce cas, nous devons supposer que l'attaque trypsique au niveau des deux points a et a' (voir schéma) est simultanée ou plutôt coopérative (cas 2, 3). Si ce n'était pas le cas (cas 2.1 et 2.2) nous devrions trouver, même transitoirement, un α long ou un β long, or, il n'en est rien.

(schéma p. 34)



cas 2.1 ou cas 2.2 ou cas 2.3



c) La perte de peptide est due partiellement au mécanisme a, partiellement au mécanisme b.

L'existence d'une double coupure au "locus a" n'exclut pas d'autres pertes de petits fragments aux extrémités N ou C terminales. Notre but n'est pas d'étudier ce problème en détail. Nos hydrolyses n'ont jamais mis en évidence l'existence des deux points a' et a mais Naslin et coll. dans d'autres conditions de force ionique (25) ont observé des produits qui pourraient correspondre à ce type de coupure.Le locus "a" correspondrait à une zone d'environ 30 acides aminés.

On sait d'autre part que sur le monomère du S-flavocytochrome b_2 une quinzaine d'autres résidus sont perdus très rapidement à l'extrémité C terminale de la chaine,transformant β en une espèce β'.Ici nous n'avons pas essayé de préciser si le produit formé était β ou β'.

2 - Origine des fragments ε et η

Plusieurs arguments montrent que ε et η sont les produits de dégradation de α :

- Du point de vue cinétique

η et ε apparaissent corrélativement et avec une vitesse égale à celle de disparition d'α . La vitesse de disparition de β est beaucoup plus petite (facteur 40) que la vitesse d'apparition de ε et η. Si d'autre part le schéma était $\beta \longrightarrow \varepsilon \longrightarrow \eta$, on trouverait une courbe en cloche pour ε .

- Du point de vue moléculaire

β (18 700 d) ne peut pas se couper en 2 fragments, ε et η dont la somme égale 27 000 daltons.

α par contre (35 300 daltons) peut se diviser en ces fragments. Des petits peptides dont la somme égale (35 300 - 27 000) = 8 300 daltons sont éliminés dans cette opération.

- Du point de vue coloration

Lorsque la coloration sous la bande α passe de 33 % à 0 %, la coloration sous les deux bandes ε et η passe de 0 à 13,7 + 18 ≃ 33 %. Pendant le même temps environ 5 % seulement de la coloration disparait sous la bande β. (Fig. 7)

On peut conclure que le monomère H du H-flavocytochrome b_2 subit
- une première coupure protéolytique le fragmentant en α (35 300 d) et β(18 700), avec perte de peptides correspondant à 35 résidus.
- α se dégrade ensuite en deux fragments : ε (14 800 daltons) et η (12 200 daltons) tandis que β , ne se dégrade que très lentement.

Le formation des deux fragments ε et η avec perte de matériel protéique (8 300 daltons) suppose l'existence sur α d'au moins deux autres loci d'attaque de la trypsine, soient "c" et "d". Nous verrons ultérieurement (cf discussion générale) comment placer ces deux points sur la chaîneα .

3 - Un autre point doit être noté concernant les valeurs trouvées pour les poids moléculaires des différents fragments H, α, β, ε et η.

Naslin et coll. proposent pour ces valeurs, des valeurs différentes des nôtres, calculées avec une droite d'étalonnage standard qu'ils avaient établie.

	Naslin et coll.		Nos valeurs	
	$\bar{m}$	P.M.	$\bar{m}$	P.M.
H	0,24	63 000	0,266	58 200
α	0,415	41 000	0,437	35 300
β	0,63	23 500	0,654	18 700
ε	0,76	17 500	0,733	14 800
η	?	?	0,808	12 200

Notons que les formes α et β que nous détectons sont obtenues à partir de conditions de protéolyse beaucoup plus actives que celles utilisées par Naslin et coll. Ces deux formes correspondent sans doute aux formes légères α' et β' signalées par ces auteurs.

Nous nous contenterons de noter ici que les deux séries de valeurs sont tout à fait voisines bien que toutes nos valeurs soient plus faibles, et que les écarts de poids moléculaire entre deux constituants se retrouvent d'une série à l'autre. Le but de ces travaux n'a pas été d'établir les relations entre ces poids moléculaires. Ce problème sera discuté à nouveau dans la discussion générale.

4 - Comparaison du H-flavocytochrome b_2 avec son "homologue" de la levure de boulangerie : le S-flavocytochrome b_2

Le schéma de dégradation par la trypsine du S-flavocytochrome b_2 avait été présenté Fig. 2 p. 7.

Nous venons de montrer que ce même schéma est valable pour le H-flavocytochrome b_2 non seulement au locus "a" mais aussi aux loci "c" et "d".

Lorsque seulement "a" est coupé, nous avons montré avec le H-flavocytochrome b_2 que l'hème reste attaché au fragment α (Tableau II). On sait (22) qu'il en est de même pour le S-flavocytochrome b_2 coupé au locus "a". Nous verrons dans le chapitre II qu'on peut étendre l'homologie des deux flavocytochrome b_2 H et S en mettant en évidence l'existence d'un H noyau cytochromique b_2.

5 - Stabilité des fragments α, β, ε et η vis à vis de la trypsine : Leur caractère de globule :

Dans le tableau I, nous avons donné une estimation, en unités arbitraires, des constantes apparentes de vitesse de dégradation protéolytique des différents fragments. Ces constantes de vitesse indiquent que β, η et ε semblent extrêmement stables ;α est moins stable que les précédents.

Pour être certains que la non dégradation de η et ε n'est pas due à l'inactivation de la trypsine dans les conditions de protéolyse, nous avons mesuré l'activité trypsique après 4 heures d'hydrolyse et nous avons observé qu'elle était identique à l'activité initiale. D'autre part le pH du milieu a été trouvé à ce moment 6,9 au lieu de 7,0 initialement ; la potentialité hydrolytique de la trypsine était donc conservée.

On peut se demander si la résistance à la trypsine de β, ε et η ne serait pas due à l'absence de liaisons peptidiques contigües à une lysine ou une arginine, sites répondant à la spécificité de la trypsine.

Une analyse globale en acides aminés faite sur le constituant "n_H" (O. Groudinsky et F. Lederer) a montré qu'il comporte 7 ou 8 lysines et 2 arginines. Dans ce fragment la résistance à la trypsine peut dont être reliée à une structure compacte et non à un manque de spécificité pour la protéase. La chaine H entière contient 43 lysines et 33 arginines que nous pouvons admettre reparties tout au long de la chaine (Lederer, non publié).

Il est donc probable que le fragment ε contient un certain nombre de ces lysines et arginines et qu'il possède les sites accessibles à la trypsine quand il est dénaturé. Ceci demandera une confirmation. Quant à β , le fait qu'il se dégrade lentement prouve qu'il a la spécificité de protéolyse requise. Nous pouvons donc proposer comme meilleure interprétation l'hypothèse que β, η et ε résistent à la trypsine en raison de leur structure compacte et "globulaire".

6 - Des rapports existants entre coupure (α,β) perte de flavine, perte d'activité:

Nous avons vu (paragraphe 3b) que la coupure H $\longrightarrow$ α + β avait lieu avec une constante apparente de vitesse $k_{app} \simeq 0{,}60\ mn^{-1}$. Pendant cette coupure la flavine reste fixée ; seulement 0,2 % sont perdus après ce stade. On savait que la flavine était indispensable à l'activité enzymatique. On peut maintenant ajouter que sa fixation n'est par une condition suffisante.

Au moment où cette coupure semble achevée, l'activité molaire apparente du H-flavocytochrome b_2 a chuté d'une valeur initiale voisine de 1000 s^{-1} à une valeur "plateau" de 40 s^{-1} environ. Autant que nous puissions le dire du fait que dans nos conditions nous n'avons pas pu analyser en détail la cinétique des deux processus rapides (coupure de H en (α,β) et passage de $H_{TN\ 1000\ s^{-1}}$ à $H_{TN\ 40\ s^{-1}}$) ceux-ci semblent correllés. Le fait qu'il en est bien ainsi avait été montré par Naslin et coll (25) travaillant dans un domaine de concentration beaucoup plus faible en trypsine.

Lorsque la perte d'activité est si forte, on peut toujours se demander quelle est la meilleure interprétation parmi les deux suivantes :

a) Toutes les molécules enzymatiques ont été transformées d'une forme initiale I en une deuxième forme X d'activité non nulle ; Ici X serait (αβ) d'activité voisine de 40 s^{-1}.

b) 95 % des molécules enzymatiques ont été transformées en une forme d'activité nulle mais 5 % ont résisté et sont restées intactes ou peu inactivées.

L'aspect nettement biphasique de la réaction de perte d'activité suggère que l'hypothèse a) est la bonne. Elle est d'autant plus vraisemblable si on compare les résultats avec ceux obtenus par Jacq et Lederer (19) pour le flavocytochrome b_2 de Saccharomyces cerevisiae. Pour ce dernier la coupure au locus "a", accompagnée de la perte d'une quinzaine de résidus provoque une chute de l'activité moléculaire d'un facteur 2, la forme S coupée en (αβ) possédant effectivement une activité propre.

La deuxième phase lente de perte d'activité semble correspondre au passage de la forme $H_{TN\ 40\ s^{-1}}$ à une forme $H_{TN \neq 0}$, transformation qui se fait avec

une constante de vitesse $k_{app} = 22 \pm 5\ 10^{-4}\ mn^{-1}$. Cette valeur est voisine de la constante de vitesse correspondant à la réaction de dégradation de β $k_{disp} = 7\ 10^{-4}\ mn^{-1}$ (voir tableau I). En même temps, la flavine serait libérée ($k_{app} = 3\ 10^{-4}\ mn^{-1}$). Ces trois vitesses semblent correllées. Si toutefois il s'avérait que les différences existant entre elles étaient significatives, il semblerait donc que la dégradation d'un seul β provoquerait la perte d'activité de plusieurs protomères probablement à la suite d'une changement de conformation de la molécule. Ceci est possible puisque nous avons montré que l'association des protomères était toujours tétramérique après la coupure.

On peut imaginer aussi que la dégradation d'un β libère la flavine et que ce soit la perte de flavine qui soit responsable de l'inactivation du tétramère ou d'un dimère dans le tétramère). Blandin et coll. ont montré, en absence d'accepteurs spécifiques que les flavines semiquinones de deux monomères du flavocytochrome b_2 étaient engagées dans une réaction de disproportionation (15,16). Nous ne savons pas si un tel phénomène peut être physiologique. Il pourrait peut être expliquer l'effet "coopératif" de perte d'activité dû à la disparition de β.

Au cours de ce premier chapitre, nous avons étudié les caractères cinétiques d'un H-flavocytochrome b_2 coupé en $(\alpha\beta)^*$(paragraphe 4). Nous avons trouvé un T.N. résiduel de 70 s^{-1} à 15°C sans modifications des K_m lactate et ferricyanure par rapport au H-flavocytochrome b_2 intact. Au paragraphe 3b nous avons trouvé un T.N. résiduel de 40 s^{-1} à 15°C pour un échantillon de H-flavocytochrome b_2 également coupé en (αβ). Pour comparer ces valeurs nous devons appliquer le coefficient correctif dû à la température. Il peut être calculé à partir des valeurs des T.N. pour l'enzyme intact à 30° et à 15° soit ($1000\ s^{-1}/500\ s^{-1}$) = 2. En extrapolant à 30°C la valeur de T.N. de 70 s^{-1} à 15°C nous obtenons donc 140 s^{-1}. Cette valeur est très différente de la valeur 40 s^{-1} trouvée par ailleurs:

Nous pourrions expliquer cette différence par la présence de 10 % de forme de pleine activité (1000 s^{-1}) et de 90 % de forme d'activité 40 s^{-1} donnant une activité apparente de 140 s^{-1}. Si ceci était vrai, nous aurions dû voir ces 10 % de monomère intact par électrophorèse, GPA, SDS. Or il n'en est rien. On doit donc attribuer à une autre raison la différence de T.N. de l'enzyme coupé en (α, β) dans les deux expériences. On peut penser que cette différence est due au fait que nous avons utilisé deux préparations différentes d'enzyme.

Il est intéressant de remarquer que la coupure de α aux loci c et d, donnant ε + η + γ, qui prend place avec une constante apparente de vitesse de $300\ 10^{-4} mn^{-1}$ ne semble pas en elle-même provoquer une chute détectable de l'activité molaire (k perte d'activité = $22.10^{-4} mn^{-1}$). Nous verrons dans la discussion générale comment interpréter ce résultat.

* d'après le test d'électrophorèse GPA, SDS.

C H A P I T R E I I

CARACTERISATION DES DEUX ESPECES MOLECULAIRES T-FLAVOPROTEINE ET NOYAU CYTOCHROMIQUE b_2 SEPAREES APRES HYDROLYSE TRYPSIQUE.

Introduction

Dans la première partie de cet exposé nous avons montré comment une protéase de forte spécificité, la trypsine, TPCK, coupait la chaîne monomérique du H-flavocytochrome b_2 en deux fragments α et β et comment le moins stable d'entre eux, α, se dégradait lui-même en deux "globules" protéiques ε et η qui demeuraient stables dans les conditions d'hydrolyse.

Les globules β, ε et η, formant des domaines structuraux pouvaient-ils être chacuns associés à une fonction ?

Une flavoprotéine ayant été observée par O. Groudinsky lors d'une expérience préliminaire de trypsinolyse du H-flavocytochrome b_2, nous avons cherché à mettre au point une méthode expérimentale permettant d'obtenir ce dérivé de façon reproductible avec le meilleur rendement.

Nous avons ensuite fait des analyses systématiques pour caractériser ce dérivé, trouver à quelle zone de la chaîne polyeptidique intacte il correspondait, tenter d'établir une relation avec l'un ou plusieurs des "globules" définis au chapitre I. Nous avons recherché, enfin, s'il avait conservé le site du substrat, c'est à dire la possibilité d'avoir une activité catalytique.

1 - Préparation du dérivé trypsique flavoprotéique ou T-flavoprotéine

Cette préparation a été faite 7 fois dans des conditions différentes avec des rendements généralement faibles (de 3 à 7 %) sauf dans l'expérience n° 7 ou il atteignait 52 %.

Nous décrirons ci-dessous deux expériences typiques qui ont été analysées avec le plus grand détail, l'une parmi les expériences à faible rendement (préparation n° 1), l'autre étant la préparation n° 7.

a) Préparation n° 1

Le flavocytochrome b_2 (3,6 mg/ml) a été protéolysé par la trypsine TPCK (c'est à dire débarassée de l'activité chymotrypsique) (2 mg/ml) en tampon lactate 300 mM, pyrophosphate de sodium 50 mM E.D.T.A. 0,1 mM pH 7 pendant 120 mn à 20°C. 60 mg, c'est à dire environ 1 µmole de H-flavocytochrome b_2 ont été ainsi traités. Après ce temps de 120 nm, l'hydrolysat a été mis à 0°C pendant 1 mois précipité par le sulfate d'ammonium à 85 % de saturation. Après centrifugation, le culot a été redissout dans un volume minimum de tampon phosphate 0,1 M, pH 7 et déposé sur une colonne de Séphadex G-100 (l = 40 cm, Ø 2,5 cm) équilibrée avec le même tampon. Le débit du tampon éluant est réglé par une pompe péristaltique (0,32 ml/mn).

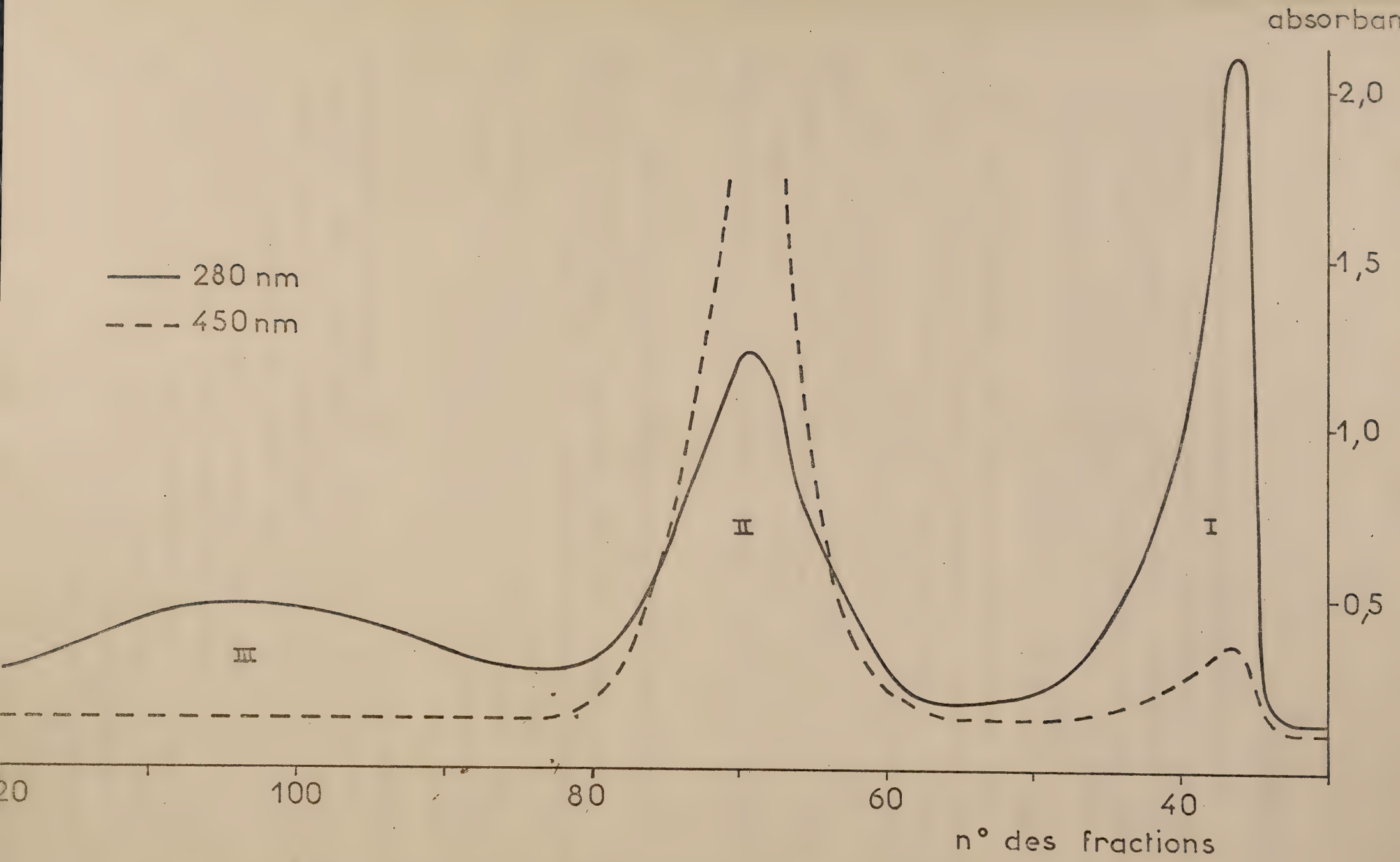


Figure 14 : Diagramme d'élution d'un hydrolysat trypsique du H-flavocytochrome b_2

(préparation n° 1) sur gel de Séphadex G-100 (Ø 2,5 cm ; l = 40 cm)

L'élution est suivie à deux longueurs d'onde UV 280 nm et visible 450 nm avec absorptiomètre à forte largeur de fente. Il convient de souligner qu'il s'agit d'une filtration moléculaire en milieu non dénaturant.

On voit d'abord sortir un composant jaune puis un composant rouge.

La figure n° 14 montre l'élugramme obtenu. Il présente trois pics d'absorption bien résolus. Nous examinerons successivement leurs caractères.

Pic I : Il correspond à un volume d'élution de 74 ml. Il est dissymétrique. Sa forme, ainsi que la valeur de ce volume d'élution indiquent qu'il correspond à un ou des composants exclus dans le volume mort de la colonne. C'est le composant jaune, dont nous avons parlé plus haut qui par sa couleur, évoque évidemment une nature flavoproteique. Sur l'élugramme le rapport UV/vis est d'environ 6.

Cette identification est évidente d'après le spectre d'absorption d'une de ses fractions (Fig. n° 15 D). Cependant le faible accident à 413 indique la présence d'une trace de cytochrome correspondant en mole d'hème par mole de flavine à environ 1% (respectivement 0,9 %, 1,1 % et 1,3 % pour les fractions n° 37, 38, 39). Ce calcul est fait en prenant pour le FMN à 413 nm la valeur ε_{ox} = 8 $mM^{-1}cm^{-1}$, à 450 nm la valeur 12,5 $mM^{-1}cm^{-1}$ et pour le cytochrome $\varepsilon_{413\ ox}$ = 129 $mM^{-1}cm^{-1}$.

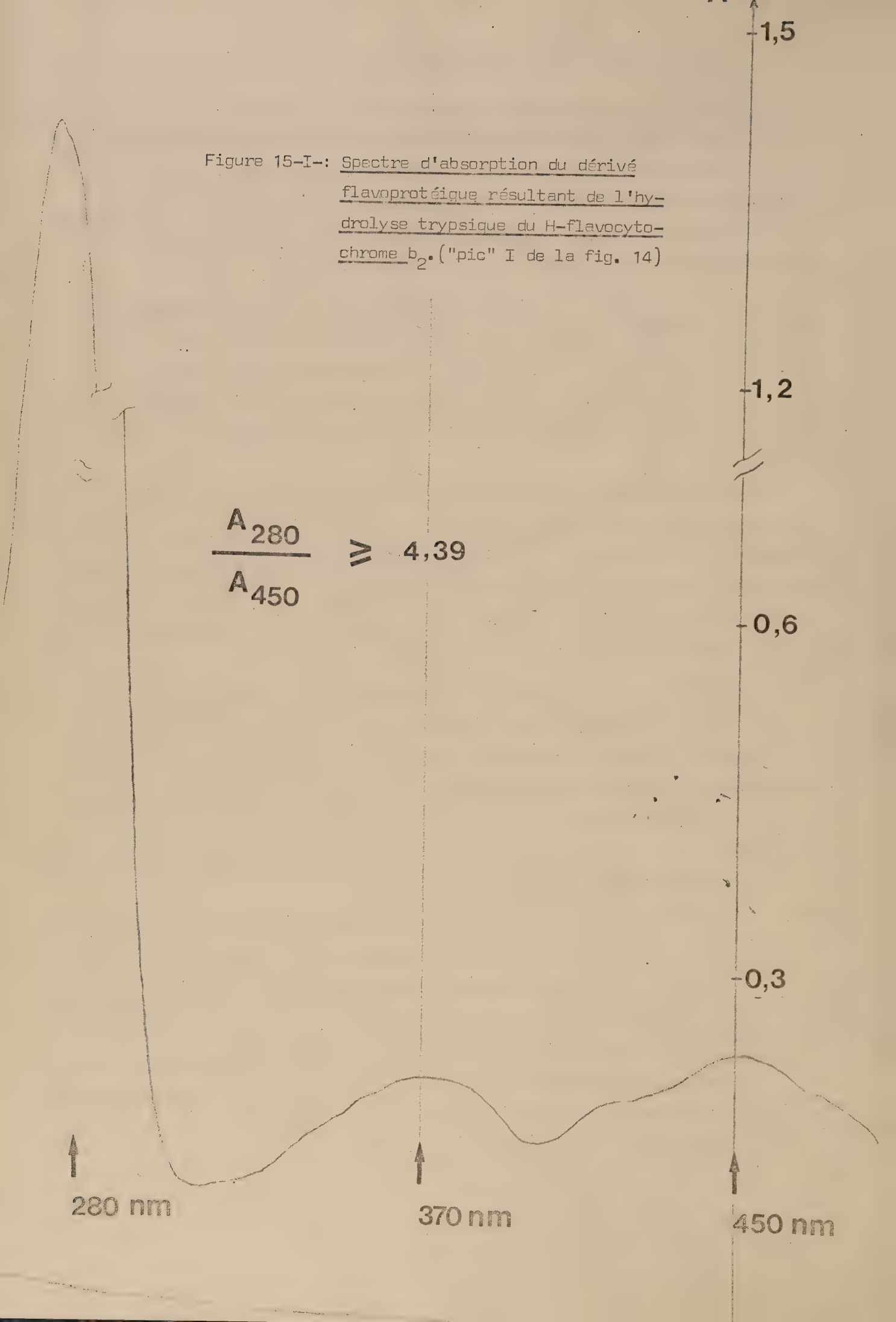
Si l'on dose la teneur en flavine des différentes fractions telle qu'on peut la mesurer selon la méthode classique (cf Matériels et Méthodes) par dilution dans l'urée (concentration finale 3 M) et observation spectrofluorométrique de la fluorescence (étalonnage avec FMN commercial) on voit que le profil de localisation de la flavine suit le profil de l'absorbance à 280 nm (Fig. 16).

Le rapport A_{280}/A_{450} mesuré au Cary 15 est de 4,4 environ, alors qu'il est de 2,6 pour la flavine libre.

D'autre part, quoique la flavine soit présente, sa fluorescence intrinsèque est éteinte comme elle l'est dans le flavocytochrome b_2 initial. La flavine est donc fixée à une partie protéique. Nous appelerons T-flavoprotéine cette fraction par analogie avec la nomenclature de Strittmatter pour le dérivé trypsique de la NADH cytochrome b_5 flavoréductase de foie (62).

Les fractions correspondant au pic I sont réunies et précipitées à 85 % de saturation en sulfate d'ammonium. Les propriétés de cette T-flavoprotéine seront étudiées plus loin.

Figure 15-I-: Spectre d'absorption du dérivé flavoprotéique résultant de l'hydrolyse trypsique du H-flavocytochrome b_2. ("pic" I de la fig. 14)



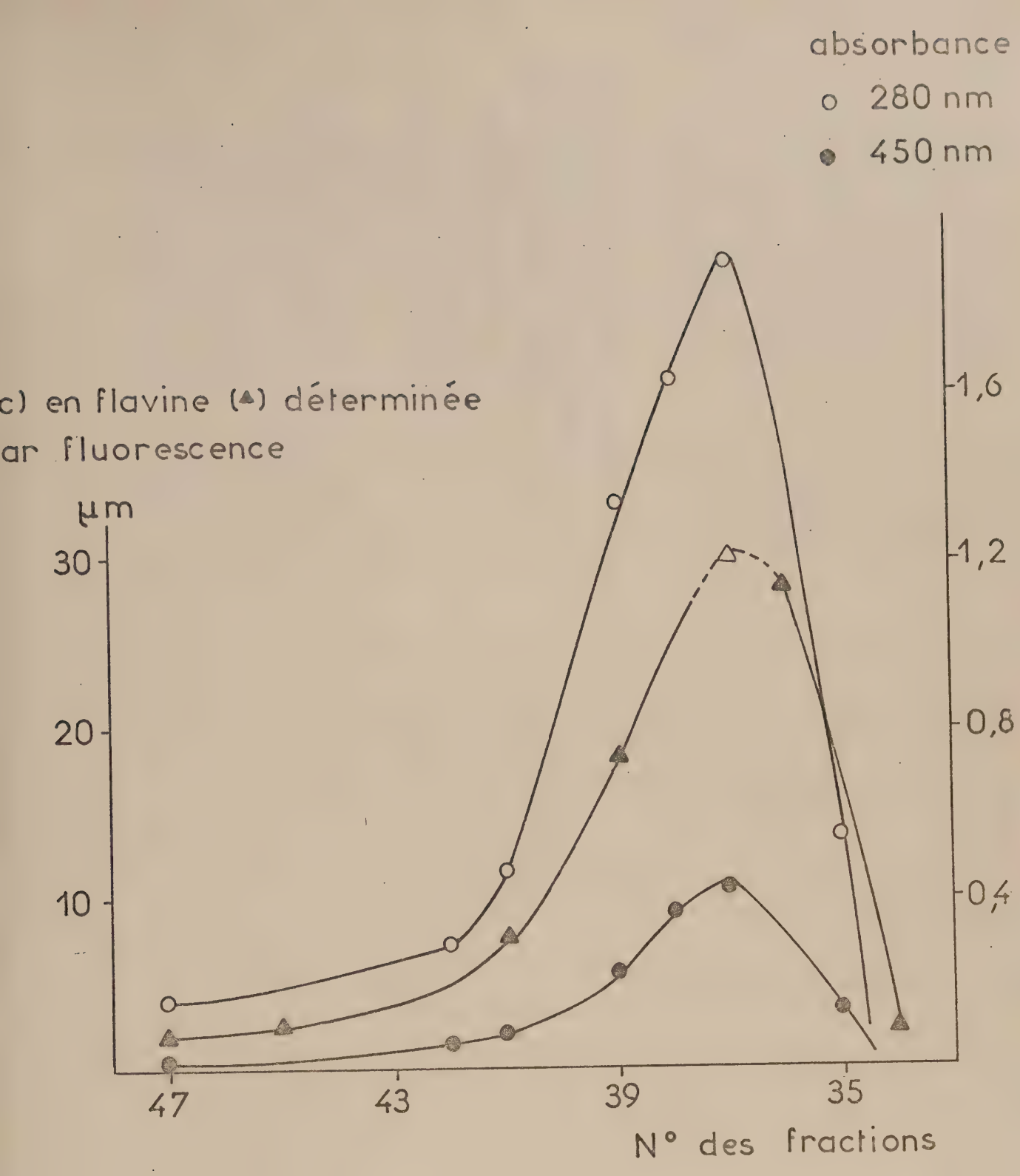


Figure 16 : Analyse des fractions constituant le pic I de l'élugramme de la figure 14.

- en spectrophotométrie (450 nm et 280 nm)
- en fluorescence (λ excitation 450 nm
  λ émission ≃ 530 nm)

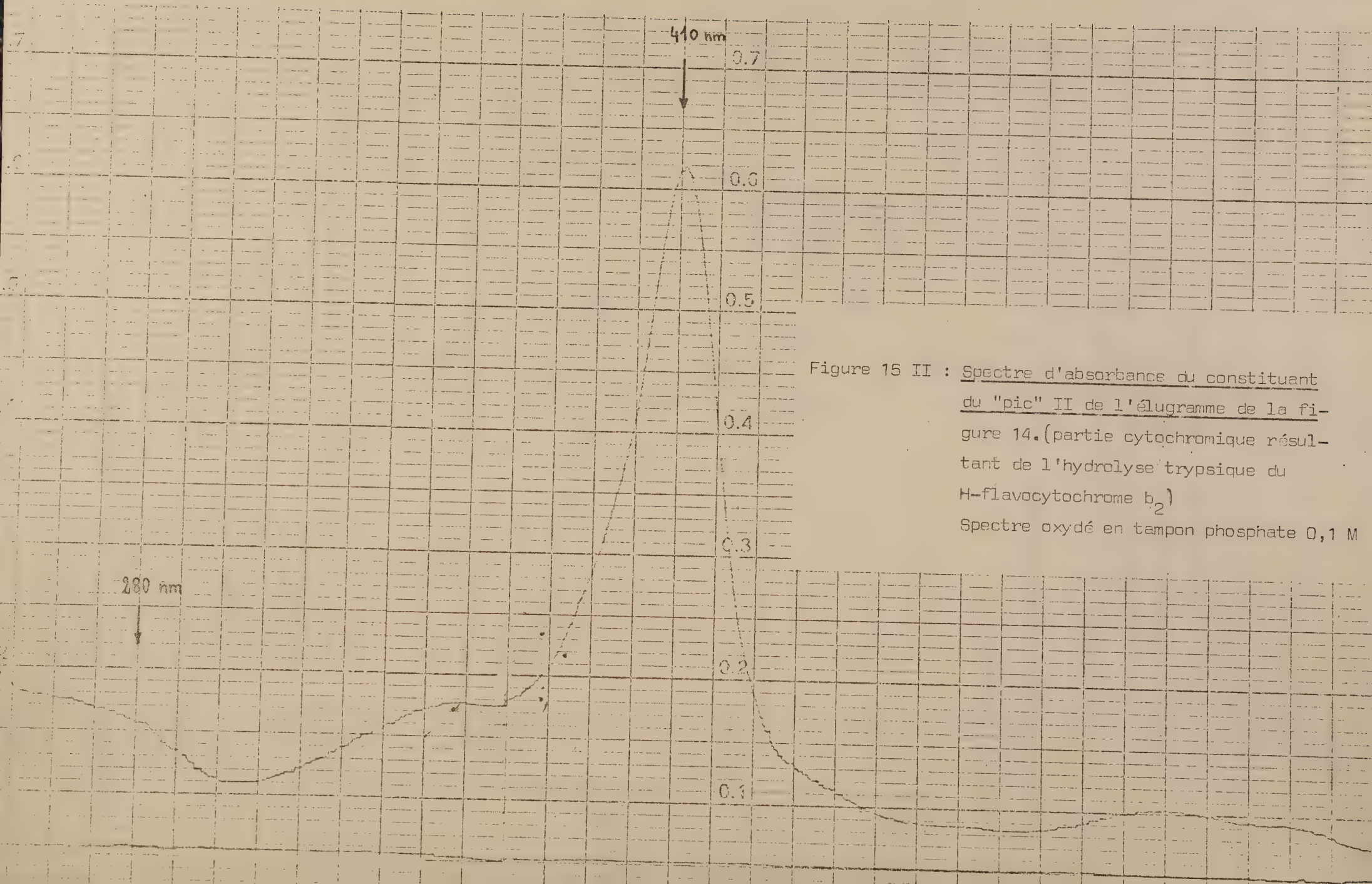


Figure 15 II : Spectre d'absorbance du constituant du "pic" II de l'élugramme de la figure 14. (partie cytochromique résultant de l'hydrolyse trypsique du H-flavocytochrome b_2)
Spectre oxydé en tampon phosphate 0,1 M

Pic II : Il correspond à un volume d'élution de 140 ml. Il est symétrique et d'apparence homogène. C'est le composant rouge repéré à l'oeil, de nature évidemment hémoprotéique. La valeur de son volume d'élution indique une masse molaire compatible avec celle du noyau cytochromique b_2. Son spectre (Fig. 15 II) appuie cette identification. L'absence de fluorescence à 530 nm (exc. 450) en urée indique l'absence de flavine. Les fractions correspondantes sont regroupées et précipitées. Nous confirmerons plus loin qu'il s'agit bien du noyau cytochromique b_2 (mélangé à de la trypsine).

Pic III : Il s'agit d'un pic très large, d'absorbance faible dans l'U.V. comme en visible, centré sur Ve = 180 ml, correspondant à des peptides et de la flavine libre qui ont été aussi précipités avant le dépôt sur la colonne lors de la précipitation à 85 % de sulfate d'ammonium.

En conclusion après cette protéolyse trypsique nous trouvons après séparation sur Séphadex G-100 en milieu non dénaturant :

1/ Une T-flavoprotéine associée en polymères de haut poids moléculaire puisqu'exclus de la colonne.

2/ Un composant que nous appellerons noyau cytochromique b_2 jusqu'à son identification.

3/ des peptides et de la flavine libre.

b) Préparation n° 7

Le flavocytochrome b_2 (4,8 mg/ml) est protéolysé par la trypsine (2 mg/ml) en tampon L.P.E. pH 7, 20°C pendant une heure.
74 mg de H flavocytochrome b_2 sont ainsi traités (1,2 µmole). L'hydrolyse est arrêtée par le froid (0°C) et l'hydrolysat est maintenu 65 heures à 4°C. Il est ensuite précipité à 55 % de saturation en sulfate d'ammonium, centrifugé 10 mn à 20 000 g et le culot est immédiatement dissout dans un minimum de tampon Tris 150 mM, oxalate de sodium 50 mM, pH 6,5. La solution est déposée sur une colonne de Séphadex G-200 (L = 40 cm, Ø 2,5 cm) équilibrée avec le même tampon, et éluée à 4°C.

L'élution est suivie simultanément à deux longueurs d'ondes 280 nm et 450 puis 413 nm. La figure 18 montre le diagramme d'élution obtenu. Ce diagramme se caractérise par deux pics :

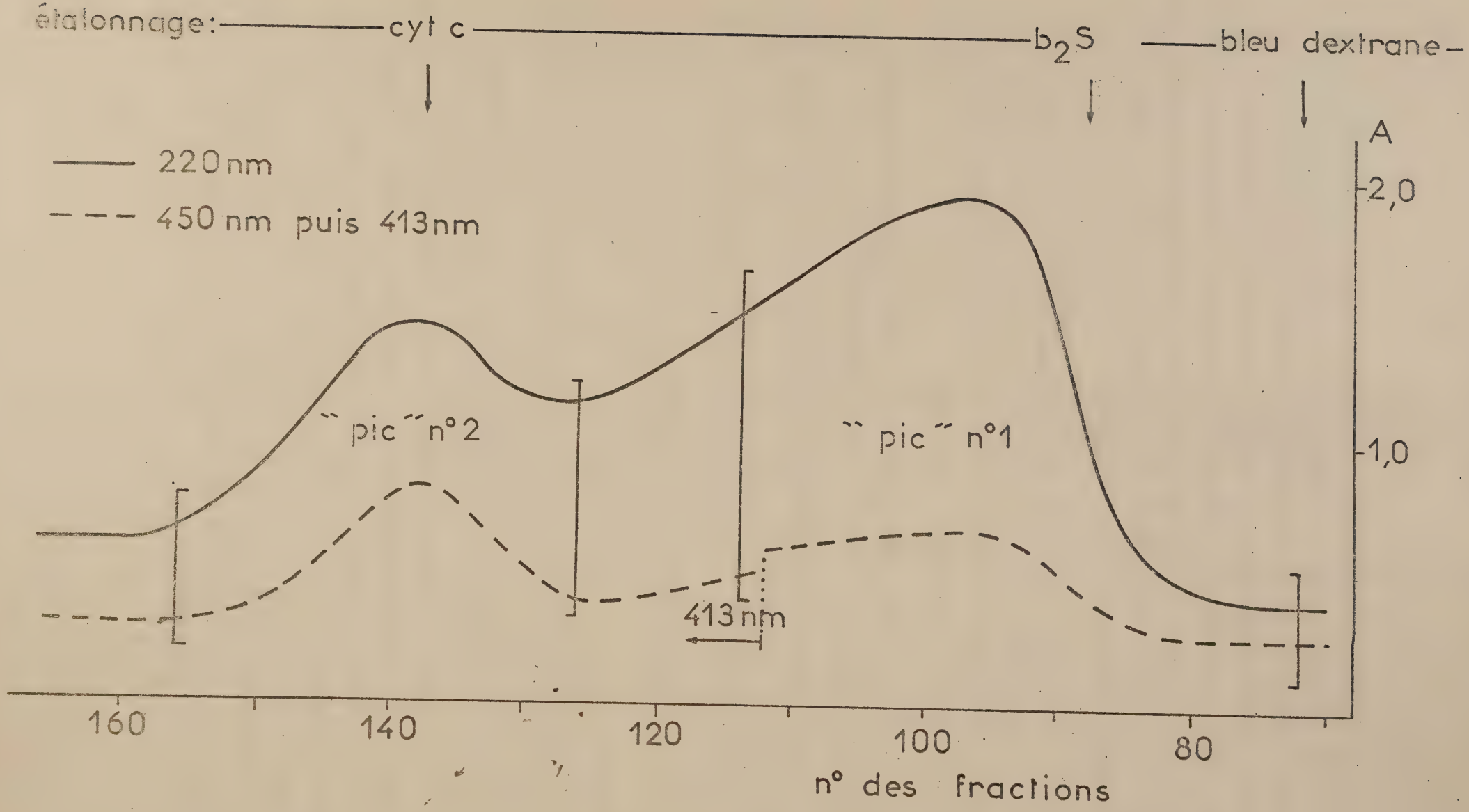


Figure 18 : Diagramme d'élution d'un hydrolysat trypsique du H-flavocytochrome b_2 (préparation n° 7) sur gel de Séphadex G-200.
(b_2H) = 4,8 mg/ml ; (trypsine) = 2 mg/ml .

Pic n° I : de K_{av} = 0,26 (V_{el} = 107 ml)
correspondant à un poids moléculaire de 150 000 daltons. Les fractions de ce pic sont jaunes, contiennent la flavine fixée mais sont contaminées par environ 5 % d'hème.
Le constituant de ce pic est donc presque essentiellement flavoprotéique.

Pic n° II : de K_{av} = 0,72 (V_{el} = 161 ml)
correspondant à un poids moléculaire d'environ 12 000 daltons. Les fractions de ce pic sont rouges, leur spectre identique à celui de la figure 16. Il s'agit donc essentiellement d'un constituant cytochromique. Un peu de flavine libre contaminante (13 %) est décélée par analyse fluorométrique.
(La colonne a été étalonnée avec du S-flavocytochrome b_2 PM = 235 000 V_e = 98 ml et du cytochrome c (V_{el} = 166 ml).

Dans ces conditions nous avons donc séparé également un constituant flavoprotéique d'un constituant cytochromique.

Bilan des teneurs en hème et flavine fixés des pics d'élution après dépôt sur colonne de Séphadex de la fraction de l'hydrolysat précipitée au sulfate d'ammonium (voir tableau VI).

Le dépôt sur la colonne n'était pas, pour chacune des préparation 1 et 7, l'hydrolysat total mais seulement la fraction précipitée en sulfate d'ammonium à la concentration indiquée.

Tableau VI

	Préparation n° 1 (précipitation à 85 % S.A.)		Préparation n° 7 (précipitation à 55 % S.A.)	
	Pic I	Pic II	Pic I	Pic II
T-flavoprotéine (1)	7 %	0	51 %	0
cytochrome (2)	0	11 %	2,5 %	40,5 % (3)

1) Rendement exprimé en FMN fixé/FMN contenu dans le flavocytochrome b_2 initial.
2) Rendement exprimé en Hème/Hème initial
3) 40 % de l'hème initial sont présents dans le pic II mais 39 % n'ont pas été déposés sur la colonne, étant restés dans le surnageant de la précipitation à 55 % de saturation en sulfate d'ammonium.

Ces résultats qui seront discutés plus loin mettent en évidence le faible rendement en T-flavoprotéine dans la préparation 1. Des sept préparations, seule la préparation n°7 a donné un rendement en T-flavoprotéine supérieur à 7 %.

2 - Caractérisation de la T flavoprotéine (Pic I).

A - Détermination des poids moléculaires

1) Préparation n° 1

a) Poids moléculaire en milieu non dissociant :

Le volume d'élution sur Séphadex G-100 et G-200 est très voisin du volume d'exclusion. Une détermination soignée a donné la valeur K_{av} = 0,03 sur Séphadex G-200 conduisant à une estimation de PM > 600 000 daltons.

Comme le poids moléculaire d'une chaîne intacte de flavocytochrome b_2 est environ 60 000 daltons, le flavopeptide obtenu dans cette expérience est évidemment sous une forme oligomérisée et/ou aggrégée.

Cette oligomérisation ou aggrégation n'est pas atténuée significativement en milieu β mercaptoéthanol, ainsi que le montre le tableau suivant :

	Volume d'élution	K_{av}	Poids moléculaire
bleu dextrane	15,4 ml ± 0,3 ml	0	∞
Flavo dérivé seul	15,9 ml ± 0,3 ml	$0,01 < K_{av} < 0,04$	PM > 600 000
Flavodérivé + β mercaptoethanol	16,3 ± 0,3 ml	$0,02 < K_{av} < 0,05$	PM > 600 000

Les poids moléculaires indiqués sont déduits des courbes données par Pharmacia (67).

b) Essais de dépolymérisation :

L'état polymérisé du flavodérivé nous gênait en fait pour de nombreuses raisons aussi bien pratiques (difficulté à le dissoudre, précipitation spontanée dans les tubes sans agent précipitant) que théorique (la fixation de la flavine n'était-elle pas une conséquence de la polymérisation ?)

Nous avons donc essayé d'employer des agents dissociants.

En choisissant comme témoin de dépolymérisation la décroissance de l'intensité de la lumière diffusée par un échantillon à la longueur d'onde d'excitation, sur le fluorimètre, nous avons exploré quelques agents dissociants tels que le S.D.S. et l'urée. Nous avons ainsi trouvé une concentration d'urée (40 mM) pour laquelle on semblait avoir un minimum de lumière diffusée.

Nous avons essayé de faire une ultracentrifugation dans ce milieu et de déterminer un coefficient de sédimentation (voir Matériel et Méthodes). La solution était apparemment monodisperse avec $S_{app\ 4°C}$ = 5,45 S (pour une concentration de 3,1 mg/ml). En appliquant le coefficient de correction défini dans Matériel et Méthodes nous avons $S°_{20,w}$ = 10,0 S

Ce coefficient de Svedberg est voisin de celui trouvé pour le tétramère du H-flavocytochrome b_2 par Baudras et Spyridakis ($S_{4°}$ =5,7 Svedberg ; $S_{20°,w}$ = IO,I S).On peut donc penser qu'en urée 40 mM,la T flavoprotéine a un poids moléculaire voisin de celui du tétramère , ayant perdu une grande partie de la suragrégation qu'elle avait sans urée. Nous avons contrôlé par un test de fluorescence que dans la solution ultracentrifugée 85 % de la flavine était demeurée fixée. Cette expérience nous a prouvé qu'il n'y avait pas de lien entre la désagrégation et la libération de la flavine. Malheureusement le matériel s'est abimé très vite dans ce milieu et la turbidité a vite augmenté. Ce n'était donc pas la solution idéale pour dépolymériser le flavodérivé.

2) Expérience n° 7

Dans l'expérience n° 7, la T flavoprotéine n'est pas agrégée ; son poids moléculaire indiqué par l'étalonnage de la colonne et son K_{av} est évalué à 150 000 daltons (voir Figure 18). Nous verrons dans le paragraphe suivant que cette valeur correspond à une forme tétramérique.

B - Composition en sous-unités et leur poids moléculaires

L'analyse de la T-flavoprotéine par électrophorèse GPA, SDS après dénaturation a été faite sur chaque préparation et sur un pool correspondant au mélange des différents échantillons (Figure 17). Dans chaque cas le gel présentait deux bandes de coloration voisine. Le pool des préparations présentait aussi les deux mêmes bandes dans les mêmes proportions.

De plus chacune des bandes après électrophorèse GPA,SDS présentait sur le tracé "densitométrique" un aspect symétrique et monodisperse indiquant que toutes les préparations avaient abouti à des fragments de poids moléculaires identiques ou plutôt non distinguable par cette technique .

Les mobilités électrophorétiques des fragments correspondant à ces deux bandes ont été étudiées de façon précise (tableau VII).

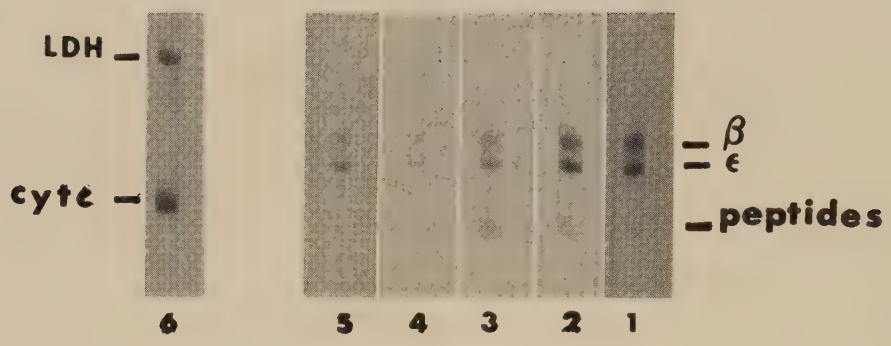


Figure n°17 : Caractérisation de la fraction T-flavoprotéine (=pic I) en électrophorèse GPA,SDS .

gels 1à 4 : différentes préparations de T-flavoprotéine
gel 5 : pool de 3 préparations
gel 6 : étalonnage

Tableau VII

Constituants protéiques présents au niveau de la T-flavoprotéine éluée dans le pic I sur gel de Séphadex.

	mobilité : m_1	mobilité : m_2	S_1/S_2 (1)	ε/β (1)
Préparation 1	0,69 0,68	0,75 0,74	1,05 1,13	$\simeq$ 3
Préparations 1 à 6	0,663 (9 valeurs) σ = 0,019	0,732 (9 valeurs) σ = 0,019	1,17 (3 valeurs) σ = 0,12	$\simeq$ 3
Préparation 7	0,65 0,65	0,72 0,72	1,85	$\simeq$ 2
Identification	β (18 700 d)	ε (14 800 d)		

Note (1) S_1 et S_2 sont les surfaces des pics "densitométrés" (en unités arbitraires). Utilisant pour les valeurs de l'efficacité des colorations de chacun des deux fragments identifiés les valeurs déterminées au Chapitre I, on peut établir le rapport molaire ε/β.

Ces mobilités trouvées pour les bandes 1 et 2 de la T-flavoprotéine sont respectivement identiques à celles des fragments "globulaires" β et ε caractérisés dans le chapitre I: β(18700 daltons) et ε(14800 daltons).

D'après le tableau $\bar{V}$ chapitre I, on sait que les "colorations molaires" de β et ε sont dans le rapport$\simeq$3,7. Le rapport des colorations $S_1/S_2 = 1,17 \pm 0,10$ indique que la composition de la T flavoprotéine polymérisée pourrait être de 3 ε pour 1β .

La T flavoprotéine est obtenue par exclusion d'un gel de Séphadex G-100. Il n'est pas impossible que les formes ε agrégées soient exclues en même temps que des espèces moléculaires $(\varepsilon\beta)_n$ ou $(\varepsilon_2\beta)_n$. Dans le cas de l'expérience n° 7, nous avons un rapport $\varepsilon/\beta = 2$. Nous discuterons ce point ultérieurement.

2 bis : Caractérisation de la fraction cytochrome (pic II)

Parallèlement à l'analyse de la T-flavoprotéine, nous avons effectué l'électrophorèse GPA, SDS d'aliquotes correspondant au pic II (constituant hémoprotéique) des deux préparations 1 et 7. Le tableau VIII présente les résultats de cette étude.

Constituants protéiques présents au niveau du cytochrome élué dans le pic II sur gel de Séphadex.

	mobilité bande 3	mobilité bande 4	mobilité bande 5
Préparation 1	0,59 0,57	absente	0,82 0,80
Préparation 7	0,55 0,58	0,61 0,65 (peu)	0,80 0,82
	$\bar{m} = 0,57$	$\bar{m} = 0,63$	$\bar{m} = 0,81$
Identification	trypsine	β	η

Tableau VIII

La bande $\bar{m}_3 = 0,57$ correspond selon l'identification du chapitre I à la trypsine résiduelle, la bande $\bar{m}_5 = 0,81$ correspond au noyau cytochromique de masse 12 200 daltons. La bande $\bar{m}_4$ (uniquement visible dans la préparation 7 révèle la présence de β sans doute libre et monomèrique. à l'état de traces.

Etant donné la faible résolution de la colonne de Séphadex G-100 ou G-200 dans cette zone de poids moléculaire, il n'est pas étonnant de retrouver la trypsine résiduelle (et β) au niveau du noyau cytochromique b_2.

Le constituant cytochromique du pic 2, a été ultérieurement purifié (méthode non décrite) sur un Séphadex G-100. Il s'agit bien du fragment η de masse évaluée 12 200 daltons, c'est à dire du noyau cytochromique b_2.

3 - Dosage des tryptophanes

Nous avons fait un dosage des tryptophanes pour des préparations différentes de T flavoprotéines, ainsi que pour le H flavocytochrome b_2 et son noyau cytochromique η après purification. (méthode de purification non décrite)

Teneur en tryptophane des espèces moléculaires des pics I et II :

	T-flavoprotéine
	2,7 (1)
	3,5
Trp	2,8
FMN	4,2
	5,9

	H-flavo b_2	n cyt. b_2 purifié
		2,0
Trp	5 à 6	1,95
Hème		2,00

(1) Les chiffres donnés pour la T-flavoprotéine correspondent à des préparations différentes de ce flavodérivé.

En raison de l'hétérogénéité probable (et variable) de la T-flavoprotéine les valeurs Trp/FMN varient d'une préparation à l'autre.
D'après ces chiffres nous pouvons tenter de faire un schéma de séparation des tryptophanes au cours de l'hydrolyse :

H-flavocytochrome b_2 (5 ou 6 Trp)

↓

n (2 T) + ε + β + Ψ (3 ou 4 Trp)

↓

ε + β (3 ou 4 Trp)

pic II pic I

Ce schéma et les valeurs trouvées pour la T flavoprotéine Trp/flavine=3 ou 4 semble indiquer que le rapport (β + ε)/flavine est voisin de 1 dans la T flavoprotéine donc que la fixation de flavine (=le rendement) ne dépend que de la quantité de(β + ε)à la fin de l'hydrolyse.

4 - Etude cinétique de la T-flavoprotéine

1) Test d'activité standard (fait sur préparation n° 1).

En utilisant les conditions de mesure standard de l'activité moléculaire du H-flavocytochrome b_2 intact, avec le ferricyanure comme accepteur, on trouve une activité molaire de 1,5 à 2 sec^{-1} électron équivalent par mole de flavine fixée à 30°C, alors que pour le flavocytochrome b_2 intact, l'activité molaire est 900 - 1 200 sec^{-1} à la même température.

Comme la préparation utilisée pour ce test contenait 1 % d'hème cytochromique contaminant, on peut se demander si cet hème cytochromique correspond à des chaînes de flavocytochrome b_2 résiduelles uniquement coupées en (α β) et retrouvées dans la fraction T-flavoprotéique (non détectables, parce que trop diluées, par électrophorèse GPA, SDS). L'activité molaire par hème serait alors 150 sec^{-1}. Comme nous l'avons vu dans le Chapitre I le flavocytochrome b_2 coupé en αβ a une activité molaire d'environ 38 sec^{-1}, à30°C. Si l'hème détecté

correspond à cette espèce moléculaire, son activité propre (38 sec^{-1}) serait trop faible pour expliquer l'activité trouvée (150 sec^{-1}). De plus en raison de la vitesse très grande de coupure du monomère en α et β (voir 1ère partie) l'espèce cytochromique présente ne peut correspondre à des monomères intacts. Ces expériences indiquent donc que 1 T-flavoprotéine a vraisemblablement une activité propre quoique très faible, et que le cytochrome présent est sous une forme inactive (noyau cytochromique b_2 par exemple).

2) Réduction de la T-flavoprotéine par le L-lactate (préparation n°1)

En raison des résultats précédents, il était important de savoir si la T-flavoprotéine était, ou non, directement réductible par le L-lactate. En regardant, au Cary 15, la densité optique à 450nm d'un échantillon de T-flavoprotéine 8 µM (1,2 ml) (D.O. initiale = 0,1) on constate que l'addition et mélange rapide de 10 µl de L-lactate donnant une concentration finale 8 mM, produit une baisse immédiate (< 3 sec) de la densité optique à une valeur plateau de 0,035 . Comme les coefficients d'absorbance des flavoprotéines oxydées et réduites à cette longueur d'onde sont respectivement 12,5 $mM^{-1}cm^{-1}$ et 3 $mM^{-1}cm^{-1}$, on voit que la plus grande partie de la flavine fixée a été immédiatement réduite. Notons que la réduction indirecte de la flavoprotéine par 1 % de flavocytochrome b_2 intact ou coupé résiduel n'aurait pas donné une réduction si rapide.

3) Etude des paramètres cinétiques K_m et V_m de la T-flavoprotéine

Cette étude a été faite à 15°C avec un échantillon de T-flavoprotéine provenant de la préparation n° 7. Il contient 5 % d'hème par flavine fixée. En électrophorèse SDS on détecte effectivemnet une faible proportion d'une bande de mobilité $\bar{m}$ = 0,406 (σ = 0,09). Il s'agit du fragment α . Les expériences d'activité à L-lactate variable et ferricyanure variable, étant faites à 15°C, nous pouvons comparer les résultats obtenus à ceux connus pour l'enzyme intact et l'enzyme coupé en α + β.

	H-flavocytochrome intact	H-flavocytochrome coupé en αβ	T-flavoprotéine
K_m lactate	0,86 mM	0,99 mM	49 mM
K_m ferricyanure	85 µM	100 µM	420 µM
V_m moyen .	500 s^{-1}	70 s^{-1}	2 s^{-1}

(voir figures 19 et 20)

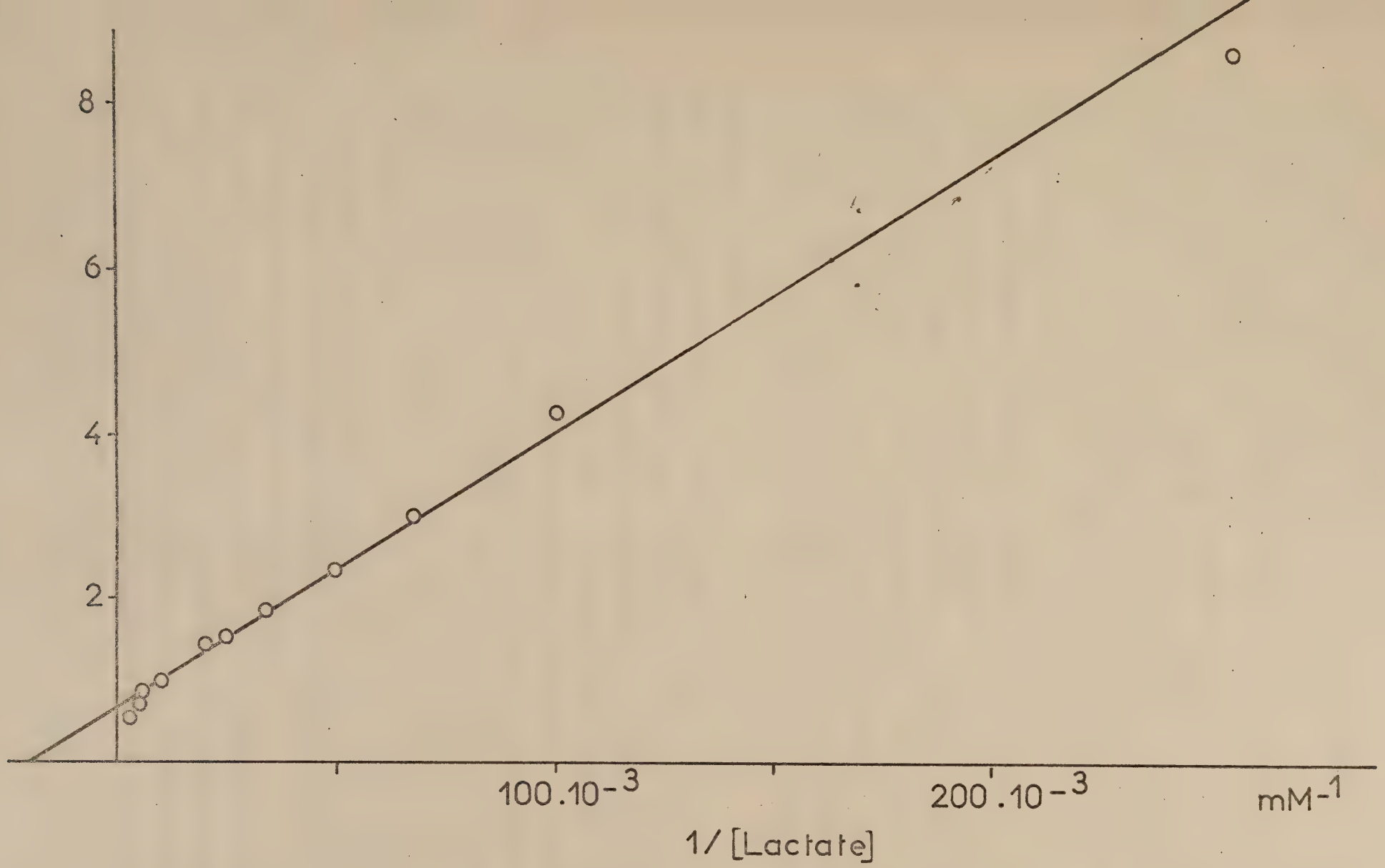


Figure 19 : Détermination des paramètres cinétiques V_m et K_m (L(+)lactate) de la T-flavoprotéine

Représentation de Lineweaver et Burk

v est exprimée en électrons équivalents transférés par mole de FMN et par seconde à 15°C.

(T-flavoprotéine) = 0,68 µM . Ferricyanure : 1,9 mM

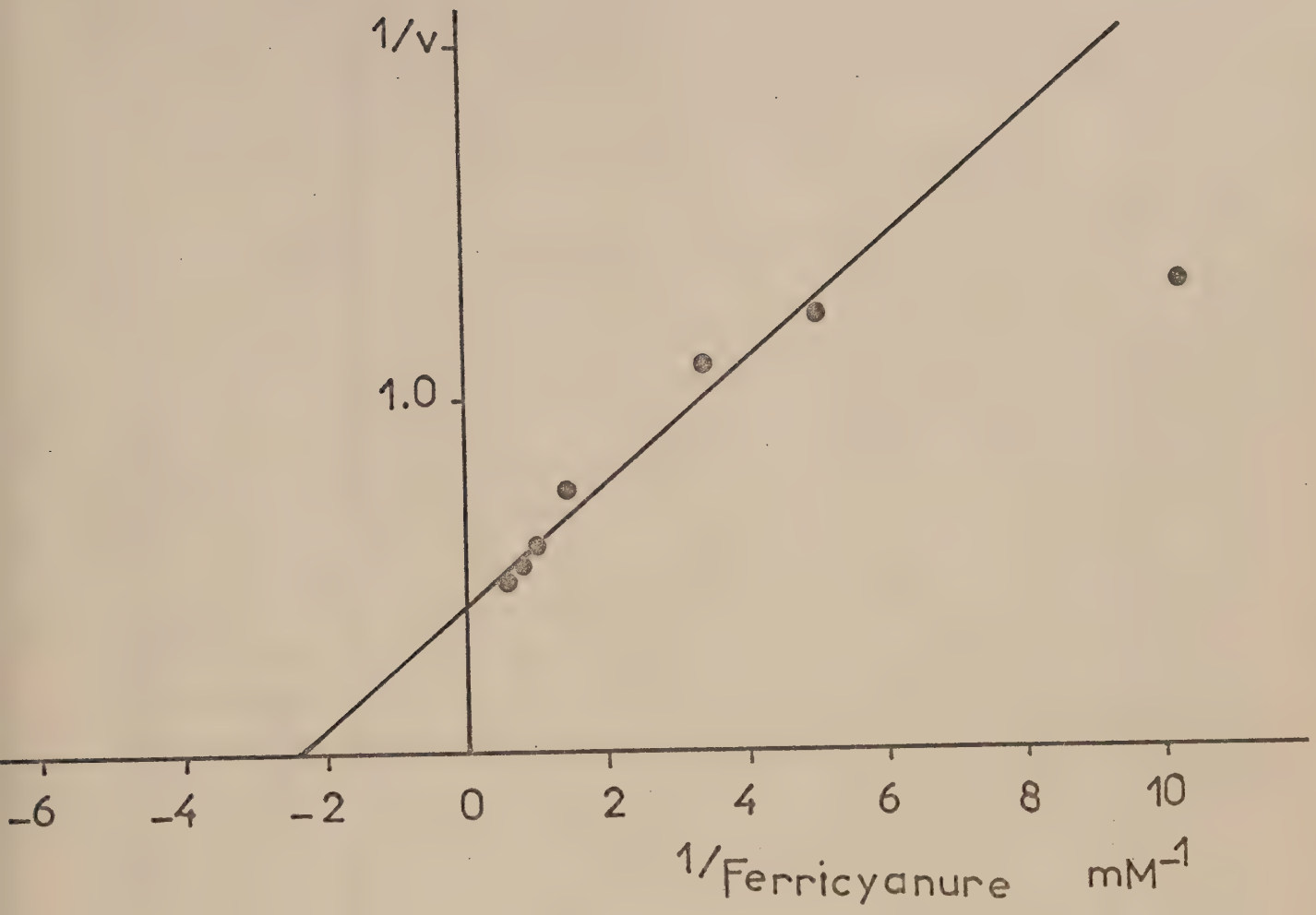


Figure 20 : Détermination des paramètres cinétiques V_m et K_m (ferricyanure) pour la T-flavoprotéine (préparation n°7)

Représentation de Lineweaver et Burk

v est exprimée en électrons équivalents transférés par mole de FMN par seconde. (T-flavoprotéine) = 0,68 µM. L(+)lactate : 200 mM

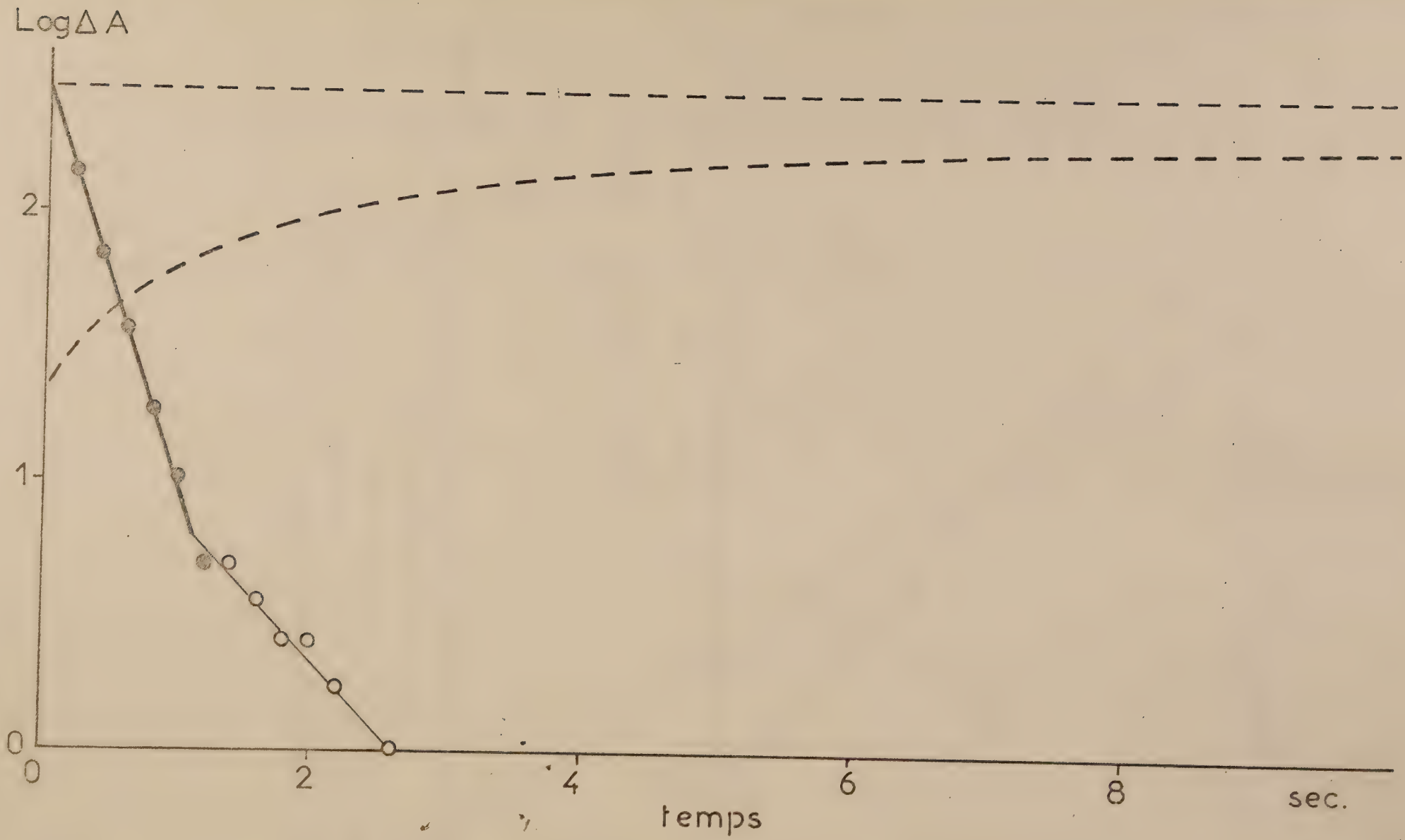


Figure 21 : Réduction de la T-flavoprotéine par le L(+)lactate en cinétique rapide

en pointillé : tracé oscilloscopique A = f(t) ; en trait plein : représentation du Guggenheim : log ΔA : f(t).

(T flavoprotéine = 14,4 µM, L(+)lactate : 5 mM final, 10°C).

Le K_m lactate de 49 mM est beaucoup plus grand (x 50) que celui de la déshydrogénase intacte. Le K_m ferricyanure est plus grand mais seulement d'un facteur 4. La vitesse maximale extrapolée aux concentrations infinies de L(+) lactate et de ferricyanure est de: V_m = 2 s^{-1} à 15° C.

Ces résultats seront discutés dans la discussion générale.

4) Etude, par cinétique rapide, de la réduction de la T-flavoprotéine par le L(+) lactate :

Cette étude préliminaire a été faite avec la T-flavoprotéine de l'expérience n°7 à 10°C. Dans cet échantillon nous avions une concentration en hème ⩽ 5 %. Nous avons suivi la réduction de la flavine à 450 nm et non pas à 437,5 nm, point isobestique de l'hème en raison de la faible absorbance du FMN à cette longueur d'onde.

En prenant pour l'hème $\Delta\varepsilon_{450nm}$ = 20 $mM^{-1}cm^{-1}$ et pour la flavine $\Delta\varepsilon_{450nm}$ = 9 mM^{-1} (53) nous avons estimé à 12 % environ la contribution de l'hème dans la variation totale d'absorbance $A_{ox} - A_{red}$ mesurée à 450 nm. Nous discuterons les résultats obtenus en tenant compte de cette présence de l'hème. Le tracé oscilloscopique montre pour les trois enregistrements (deux à L(+)lactate 5 mM et un à L(+)lactate 1 mM) la même allure biphasique (Fig. 21) (Il s'agit d'une diminution d'absorbance ; l'allure de la courbe est due à une inversion de polarité des appareils d'enregistrement).

Nous avons utilisé la méthode de Guggenheim pour exploiter ces résultats (voir Matériel et Méthodes). La Figure 21 présente un des tracés enregistrés et son traitement par cette méthode. Nous avons calculé pour chacun des trois essais les constantes apparentes de 1er ordre de réduction de la flavine prosthétique pour les deux phases (k_1 et k_2).

	1 mM	5 mM (1)	5 mM (2)
k_1 app	0,49 s^{-1}	1,39 s^{-1}	1,46 s^{-1}
k_2 app	0,12 s^{-1}	0,56 s^{-1}	0,52 s^{-1}

(2) représenté figure 21

En raison des faibles rendements en T-flavoprotéine nous n'avons pu tester d'autres concentrations de L(+)lactate.

Avant d'interpréter ces résultats, il faut examiner quelle erreur ou artéfact peut être introduit par la présence de l'hème.

A priori l'hème pourrait appartenir à du H-flavocytochrome b_2 intact, et/ou à la forme coupée en αβ, ou à une contamination par le noyau cytochromique b_2.

Dans le premier cas, d'après les données de C. Capeillère Blandin et Iwatsubo (53), le flavocytochrome lui-même serait réduit par le lactate en moins de 10 msec. Cela reviendrait à diminuer de 12 % l'absorbance initiale de la cinétique observée. La forme coupée αβ serait réduite en moins de 100 msec ; cette cinétique, qui ne produirait elle aussi que 12 % de la diminution totale d'absorbance pourrait se confondre avec la 1ère phase de réduction de la T-flavoprotéine elle-même ; comme celle-ci est suivie jusqu'à 50 % de la diminution totale, le résultat ne serait pas affecté.

Une autre possibilité serait que la T-flavoprotéine ne soit pas réduite directement par le lactate mais serve d'accepteur dans la réaction catalysée par la forme active de l'enzyme si elle est présente. Cette hypothèse n'a pas été testée expérimentalement, mais on sait que la flavine libre ou que les flavoprotéines ont une très faible réactivité comme accepteur du H - flavocytochrome b_2 (68) . Nous pouvons conclure des expériences que la cinétique observée correspond effectivement à la réduction de la T-flavoprotéine. L'aspect biphasique peut être dû à l'existence de deux espèces moléculaires de réactivités voisines avec le L-lactate.

Ne disposant que de 3 points (dont 2 pour une même valeur) nous avons tout de même cherché à évaluer $k_{app\ max}$ et K_M en portant 1/k = f(1/lactate); pour la première phase nous obtenons : $k_{app\ max} = 2{,}75\ s^{-1}$

et $K_M = 2{,}8$ mM

Ces valeurs indicatives quoique critiquables peuvent être discutées

La constante apparente maximale de vitesse de réduction de la T-flavoprotéine par le L(+)lactate ($2e^-$) mesurée en cinétique rapide à 10° est voisine de 2,7 s^{-1}. Exprimée en vitesse c'est à dire en électron transféré par mole et par seconde du lactate à la flavine, elle est donc d'environ 5,5 s^{-1}. Cette valeur n'est pas significativement différente de celle trouvée dans la catalyse à l'état stationnaire comme vitesse maximum de transfert d'électrons lorsque la T-flavoprotéine est le catalyseur de la réaction lactate $\xrightarrow{e^-}$ ferricyanure (2 s^{-1}).

Ceci montre qu'avec la T-flavoprotéine le processus limitant la réaction catalytique est encore principalement au niveau de l'étape de transfert électronique du du L-lactate fixé à la flavine prosthétique.

Des investigations ultérieures devront être envisagées pour une étude plus détaillée de ce phénomène.

	serum anti S-noyau cytochromique b_2	serum anti S-flavo cytochrome b_2
H noyau cytochromique b_2 (en µM) 1 5 10 25 50 75 100 250	—	—
H flavocytochrome b_2 (en µM) 1 5 10 25 50 100 200 500	—	—
Hydrolysat H-flavocytochrome b_2 (en µM) 5 10 20 50 100 200	—	—

Témoins :	serum anti S-noyau cytochromique b_2	serum anti S-flavo cytochrome b_2
S-noyau cytochromique b_2 3,6 µM	+	+ (54)
S-flavocytochrome b_2 6,7 µM	+ (54)	+

Figure XII

5 - Comparaison immunologique entre le H-flavocytochrome b_2 et le S-flavocytochrome b_2.

(en collaboration avec B. Guiard).

Les ressemblances immunologiques entre le H-flavocytochrome b_2 et le S-flavocytochrome b_2 sont recherchées par immunodiffusion en gel d'agarose selon la méthode d'Ouchterlony (55). La technique en est décrite dans Matériel et Méthodes .

Nous disposons de deux antiséra de lapin :

1/ un anti serum anti S-noyau cytochromique b_2

2/ un anti serum anti S-flavocytochrome b_2.

Nous avons testé ces deux stocks d'anticorps contre :

a/ le H-noyau cytochromique b_2

b/ le H flavocytochrome b_2

c/ un hydrolysat du H-flavocytochrome b_2 contenant la T-flavoprotéine + n

Des témoins ont été faits respectivement contre :

d/ le S-flavocytochrome b_2

e/ le S-noyau cytochromique b_2

Nous avons exprimé dans le tableau XII les tests immunologiques qui ont été faits, les gammes de concentrations utilisées, ainsi que les résultats (notés (+) en cas d'immunoprécipitation et (-) en absence de précipité).

Intérprétation des résultats

Ces résultats montrent l'absence de précipitation croisée entre les anticorps flavocytochrome b_2 et nb_2 de Saccharomyces et le H-flavocytochrome b_2, son hydrolysat contenant la T flavoprotéine ou le H noyau cytochromique b_2.

Dans les mêmes conditions les témoins faits avec le S-flavocytochrome b_2 sont positifs.

Il semble donc que les deux flavocytochromes b_2 ne possèdent pas les mêmes sites antigéniques.

Conclusion et discussion du chapitre II :

- Nous avons montré, par les résultats exposés dans ce chapitre qu'il était possible, après trypsinolyse du H-flavocytochrome b_2 de séparer en milieu non dénaturant une entité flavoprotéique (la T-flavoprotéine) d'une entité cytochromique (le H-noyau cytochromique b_2).

- Une méthode de préparation de ces deux entités protéiques a été mise au point. Elle permet d'obtenir la T-flavoprotéine avec une rendement de 50 % et le H-noyau cytochromique b_2 avec un rendement d'environ 80 %.

- Nous avons montré que le H-noyau cytochromique b_2 correspondaitau globule mis en évidence dans le chapitre I.

La fraction T-flavoprotéique est formée quant à elle des deux espèces moléculaires ε et β caractérisées dans le chapitre I comme des globules résistant à la trypsine.

Environ 20 % de la chaîne monomérique sont perdus sous forme de petits peptides lors de la trypsinolyse.

- Dans les préparations de T-flavoprotéine qui n'ont pas subi d'autre purification que la filtration moléculaire sur colonne de Séphadex et des précipitations au sulfate d'ammonium, on trouve un rapport β/ε compris entre 2 et 3 mais cette détermination est sujette à caution en raison des données insuffisantes concernant la coloration spécifique des bandes β et ε après électrophorèse GPA, SDS (voir chapitre I). La meilleure interprétation est que le monomère de la T-flavoprotéine est εβ.

- Nous avons vu que la T-flavoprotéine peut se trouver sous une forme caractérisée par un K_{av} = 0,26 sur Séphadex G-200, correspondant à un poids moléculaire de 150 000 daltons - ou sous des formes suragrégées de K_{av} ≃ 0,02 correspondant à des poids moléculaires supérieures à 600.000 daltons.

Cette suragrégation ne dépend pas de la présence de β mercaptoéthanol. Les interactions qui la provoquent ne sont donc vraisemblablement pas du type ponts disulfures. On sait que le globule α isolé par Ninio et coll. (31) de la forme clivée du S-flavocytochrome b_2 a une forte tendance à se polymériser alors que β reste sous forme monomérique. On sait également que le noyau cytochromique b_2 "η", fragment issu de la dégradation d'α (voir chapitre I) ne présente pas de tendance à la polymérisation, son K_{av} = 0,72 correspondant à un poids moléculaire de 12 000 daltons (cf. p. 43).

Les formes de liaison α-α se retrouvent donc localisées au niveau ε ε dans la T-flavoprotéine $(\varepsilon\beta)_\eta$

Ces résultats sont en accord avec les conclusions de C. Jacq relatives à l'étude des interactions des globules α et β dans le S-flavocytochrome b_2.

L'utilisation d'un agent couplant bifonctionnel, réactif des groupements aminés des résidus lysine, lui a permis de proposer deux sortes d'interactions dans le tétramère : des interactions α-α et des interactions α β (24).

Il a conclu que les globules β n'avaient pas d'interactions spatiales entre eux, attribuant à α les zones d'interactions des protomères dans le tétramère.

B. Guiard a montré d'autre part, par des expériences d'immuno précipitation, que les anticorps anti S noyau cytochromique b_2 réagissaient avec le S-flavocytochrome b_2 entier et vice versa (54). Ce fait suggère la position externe du noyau cytochromique b_2 dans le tétramère, confirmant notre hypothèse selon laquelle ε était la partie d'α responsable des interactions interprotomériques.

On peut imaginer que β masque les zones d'interactions hydrophobes du globule ε n'entrant pas dans l'association tétramérique. La dégradation lente de β mise en évidence au chapitre I ainsi que par son déficit dans la T-flavoprotéine polymérisée doit dévoiler ces zones hydrophobes et permettre une polymérisation à un degré plus important.

Le fait que le rapport de coloration β/ε soit nettement supérieur dans la T-flavoprotéine non agrégée (préparation n° 7) soit 1β pour 2ε) à celui trouvé pour le T-flavoprotéine agrégée confirme la relation existant entre la présence de β et le moindre degré de polymérisation.

- Nous avons montré que la T-flavoprotéine a gardé le site de fixation du substrat et une activité enzymatique dans le transfert L-lactate-ferricyanure (T.N. ≃ 2 s^{-1}). Cette activité est environ 20 fois plus faible que celle de la forme $H_{\alpha\beta}$ ou $H_{\varepsilon\eta\beta}$. Rappelons que lorsque l'hème est détaché du $S_{\alpha\beta}$ flavocytochrome b_2, la vitesse de transfert lactate flavine n'est pas modifiée mais seulement la vitesse flavine ⟶ accepteur externe (70).

- Au regard des résultats exposés dans le chapitre II, un problème se posait concernant l'explication des faibles rendements en T-flavoprotéine obtenus dans les préparations 1 à 6 et le fort rendement de la préparation n° 7 (51 %).

A la suite des faibles rendements des premières préparations, nous avons pensé que lors des étapes de précipitation au sulfate d'ammonium la trypsine se trouvait concentrée dans les culots avec le H-flavocytochrome b_2. A ce niveau, malgré la présence de P.M.S.F. l'hydrolyse doit probablement se poursuivre. Pour palier cette hydrolyse ultérieure, dans la préparation n° 7, nous avons diminué le temps effectif de l'hydrolyse contrôlée (1 heure au lieu de 2 heures). Ceci n'est qu'un pis aller, bien sûr et malgré la réussite de cette dernière préparation, nous envisageons actuellement une séparation de la trypsine de l'hydrolysat avant tout traitement au sulfate d'ammonium.

– Les tests immunologiques croisés que nous avons faits ont été négatifs. Nous avons conclu à l'absence de sites antigéniques communs aux deux flavocytochromes b_2 homologues. Cette conclusion peut être discutée. En fait, pour voir si des sites antigéniques du H-flavocytochrome b_2 se retrouvent dans le S-flavocytochrome b_2 il faudrait préparer un sérum anti-H-flavocytochrome b_2. Nous n'en disposons pas à l'heure actuelle.

De plus le test immunologique que nous avons fait est incomplet. En toute rigueur nous devrions mettre ensemble les deux antigènes à la concentration limitante de précipitation du S-flavocytochrome b_2 et regarder s'il y a inhibition par le H-flavocytochrome b_2 de la précipitation du S-flavocytochrome b_2 avec son anticorps.

Dans l'optique d'un résultat concordant nous pouvons néanmoins émettre l'hypothèse que ces deux flavocytochrome b_2 ne possèdent pas les mêmes sites antigéniques à leur surface. Il est probable que les deux levures ont beaucoup divergé au cours de l'évolution. On ne peut pas définir de façon absolue cette divergence. On rappelera en effet que malgré leurs grandes similitudes, le cytochrome b_5 de foie et le S-noyau cytochromique b_2 ne présentent pas non plus de réactions immunologiques croisées (57).

DISCUSSION GENERALE

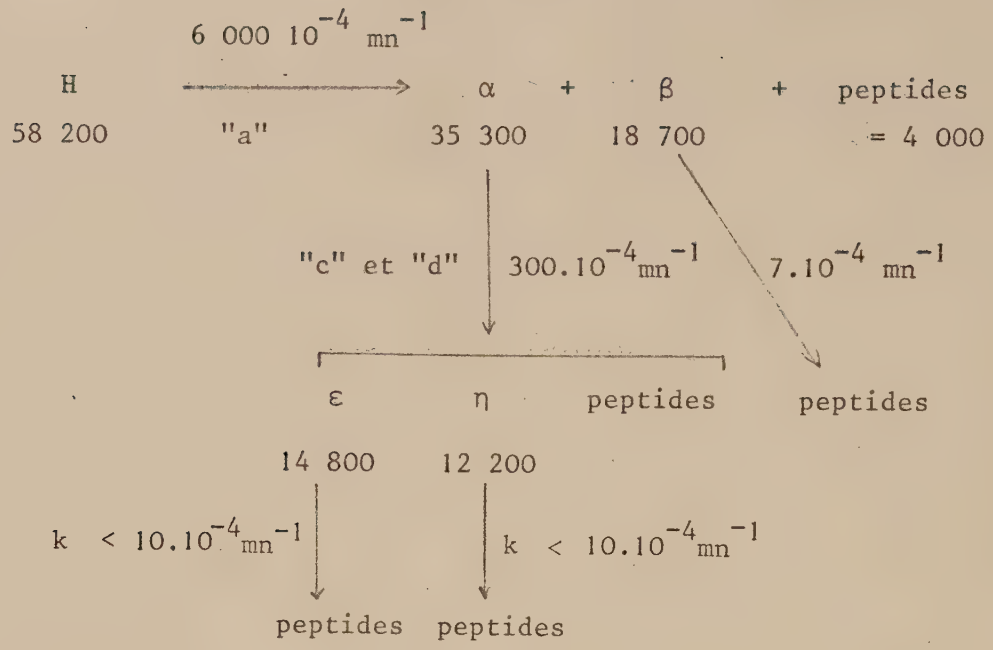


Tableau récapitulatif de la trypsinolyse du H-flavocytochrome b_2

k apparent est donné pour une concentration de trypsine de 2 mg/ml.

Dans le chapitre I, nous avons décrit comment, lorsque le H-flavocytochrome b_2 se trouve dans une conformation stable à neutralité, chacun de ses quatre protomères est attaqué par la trypsine en 3 points privilégiés "les plus sensibles" : au locus a tout d'abord, puis simultanément aux loci "c" et "d".

Les vitesses relatives de ces coupures, ainsi que les vitesses de dégradation des fragments qu'elles avaient définies ont été évaluées. La comparaison des vitesses de dégradation (k apparent) nous donne une évaluation quantitative de l'instabilité des différents fragments vis à vis d'une attaque trypsique.

En nommant, par définition "globule" tout fragment demeurant stable nous avons été amenés à poser le schéma présenté ci-contre.

La coupure en "a" (k_{app} = 0,6 mn^{-1}) de la chaîne polypeptidique H (58 200 daltons) donne deux morceaux en première approximation complémentaires : α (35 300 daltons) et β (18 700 daltons). β présente une forte stabilité ($k_{disp} \simeq 7\ 10^{-4}\ mn^{-1}$) et peut donc être considéré comme formant un "globule".
α a une certaine stabilité mais beaucoup plus faible que celle de β ; il existe sur α deux loci très sensibles à la trypsine : "c" et "d" ; leur coupure ($k_c \simeq k_D \simeq 0{,}030\ mn^{-1}$) segmente α en deux globules stables (k_{disp} est inférieur et peut être très inférieur à $10^{-3}\ mn^{-1}$).
ε (14 800 daltons) et η (12 200 daltons), avec formation de petits peptides que nous n'avons pas caractérisés représentant un total d'environ 65 résidus. Nous reviendrons plus loins sur le problème de la ponctualité des coupures dans les différents loci.

Nous avons recueilli des informations supplémentaires permettant de compléter ce schéma. En effet nous avons montré (Chapitre I) que le pseudo-globule α porte le site de fixation de l'hème. C'est donc bien l'équivalent du globule α formé par les protéases de la levure ( ) ou la chymotrypsine (69) à partir du S-flavocytochrome b_2 extrait de Saccharomyces cerevisiae.
Nous avons pu établir (Chapitre II) que ce site héminique se trouve plus précisémment sur le globule "η" (12 200 daltons). Ce globule est donc bien le noyau cytochromique b_2, homologue de celui décrit pour le S-flavocytochrome b_2

Ces résultats nous ont amenés à proposer pour le H-flavocytochrome b_2 une structure triglobulaire (voir Figure 22). Les trois globules β, ε et η se trouvent dans l'ordre proposé antérieurement pour le S-flavocytochrome b_2 sur la base de la localisation N terminale du noyau cytochromique b_2 (39).

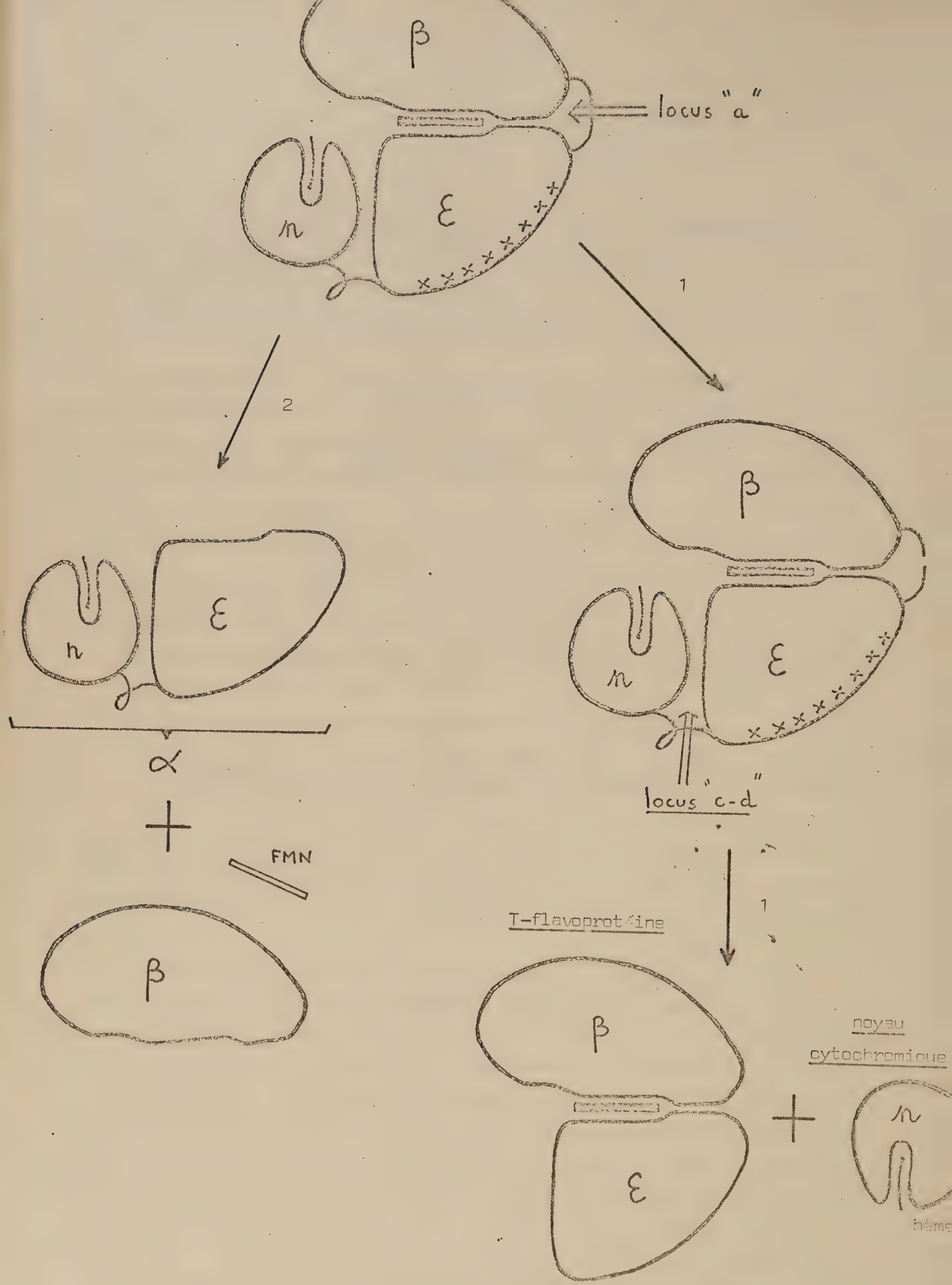


Figure 22 : Modèle triglobulaire du H flavocytochrome b_2

a, c, d : points d'attaque de la trypsine
voie 1 : séparation non dénaturante de la T-flavoprotéine et du noyau cytochromi
voie 2 : séparation de α et de β en guanidine 1 M.

La coupure au pont sensible "a" est supposée ponctuelle sur ce schéma. Il s'agit d'une approximation. L'hypothèse la plus probable est qu'il existe à ce niveau deux loci a et a' et que tout le segment aa' se trouve perdu.

Nous pouvons cependant limiter la zone sensible autour de a et a' à une valeur maximale d'une trentaine de résidus. L'existence du segment aa' expliquerait la différence significative trouvée par Naslin et coll. (25) (Δ PM = 4 400 daltons) entre les poids moléculaires du α_s de l'enzyme S-flavocytochrome b_2 "coupé", qui aurait aussi perdu ce fragment, et du α_H obtenu à très faible concentration trypsique qui l'aurait conservé.

Dans notre cas, nous n'observerions donc pas α_H en fait mais α'_H, son dérivé, homologue de α_s de l'enzyme clivé de Saccharomyces cerevisiae et le schéma réel de dégradation serait :

1/ $H \longrightarrow \alpha_{vrai} + \beta$ étape non décelée par nous

58 200 d 39 500 d + 18 700 d

puis 2/ α vrai $\longrightarrow \alpha' + aa'$

39 500 d 35 300 d + 4 200 d

d'où le schéma global que nous avons observé :

$H \longrightarrow \alpha + \beta + ?$

58 200 35 300 18 700 4 200

Nous avons placé, comme Naslin et coll, les 65 résidus environ perdus lors de l'hydrolyse $\alpha \longrightarrow \eta+\varepsilon$ sous forme d'un segment polypeptidique unique c-d formant une boucle souple entre ε et η. Rappelons que la coupure b non commentée ici avait été définie (25) comme une coupure C terminale sur la chaîne β , la transformant en β' plus courte de 15 résidus environ. Ici nous n'avons pas observé la coupure $\beta\beta'$ probablement parce que travaillant à concentration beaucoup plus forte en trypsine, nous nous trouvions déjà en présence de β' dès le début de l'observation cependant nous l'avons appelé β en négligeant pour le moment cette différence.

Nous avons figuré l'hème sur le globule η , noyau cytochromique, et la flavine localisée entre les globules ε et β selon notre hypothèse dérivée de celle de Ninio et coll. (31) qui plaçait le FMN entre les globules α et β du S-flavocytochrome b_2. Cette hypothèse expliquerait que le site flavinique ne soit présent ni sur α seul ni sur β seul mais seulement sur $\alpha\beta$.

Elle n'est pas en désaccord avec les résultats du marquage d'affinité du S-flavocytochrome b_2 par C. Mulet (71), marquage tendant à prouver que α porte le site de fixation du substrat : le L(+)lactate. La proximité spatiale des sites du L(+)lactate et de la flavine, montrée par F. Lederer (72) n'exclut

pas la possibilité que ces sites soient localisés sur deux globules différents ou bien encore que le premier soit sur un globule (α en l'occurence) et le second (le site du FMN) soit dans la crevasse dont nous supposons l'existence.

Problème des structures quaternaires, en particulier des interactions de fixation entre protomères après coupure de l'un ou plusieurs des ponts interglobulaires

La molécule tétramérique du S-flavocytochrome b_2 coupé en α et β est extrêmement stable et ne se dissocie qu'à des concentrations de guanidine ou d'urée supérieures à 3 M. Il en est de même pour l'enzyme intact.

La molécule de H-flavocytochrome b_2 tétramérique est stable aux forces ioniques élevées, se dissocie en monomères à faible force ionique en absence de L-lactate, ou en guanidine. Il existe donc entre protomères des forces de répulsion électrostatiques importantes atténuées quand la concentration saline augmente. Les forces d'attractions sont vraisemblablement de type "hydrophobe". On pouvait se demander entre quels globules s'exerçaient principalement ces forces. Il a été signalé que α_s avait tendance à former des polymères de poids moléculaire élevé diffusants et des dimères α_2 encore stables en guanidine 3M. Par contre β comme η paraissent très stables sous forme monomère et n'ont aucune tendance à l'association homologue. Lorsque le H-flavocytochrome b_2 est coupé en ($\alpha\beta$) comme son homologue S, il reste stable sous sa forme tétramérique comme nous l'avons montré au Chapitre I.

Cependant (Chapitre II) quand α_H a subi la coupure c-d la molécule se dissocie alors spontanément en milieu non dénaturant ; une simple filtration sur tamis moléculaire en tampon phosphate, à neutralité, sépare quantitativement la partie cytochromique : le noyau cytochromique b_2 monomère, de la partie flavoprotéique probablement tétramère.

On peut conclure qu'il n'existe pas d'affinité de l'un pour l'autre donc pas d'affinité de η ni pour ε ni pour β . Nous reviendrons plus loin sur les conséquences que l'on peut tirer de cette constatation sur le plan fonctionnel évolutif.

Sur la Fig 22 nous avons figuré la partie flavoprotéique comme composée de l'ensemble d'un globule ε et d'un globule β . Ce point, nous ne l'avons pas démontré mais il résulte de la meilleure interprétation que nous pouvons donner à nos résultats.

En effet, dans nos préparations de T-flavoprotéine obtenues d'abord avec un très faible rendement (3 à 7%), en raison d'une hydrolyse trop avancée, nous avions perdu beaucoup du globule β, moins stable que ε, et nous trouvions pour la T-flavoprotéine surpolymérisée une composition $\varepsilon_3\beta$.

Dans la dernière préparation, où le rendement était monté à 51 % nous trouvons une T-flavoprotéine non surpolymérisée apparemment tétramérique, ayant une composition moyenne $\varepsilon_2\beta$ suggérant une structure $\varepsilon_4\beta_2$.

Il est logique de penser qu'une préparation de rendement 100 % sans perte de β aboutirait à $(\varepsilon\beta)_4$.

Ces résultats indiquent d'autre part que c'est au niveau de l'affinité ε -ε que réside la principale stabilité du tétramère. Nous nous étions proposés de savoir quelles modifications la coupure de H en αβ puis la coupure ultérieure de α suivie de dissociation en εβ et η avait sur les caractères cinétiques de cette lactate déshydrogénase. Nous voulions savoir également si la T-flavoprotéine avait ou non gardé le site de fixation du substrat et la possibilité d'avoir une activité lactate déshydrogénase propre.

Nous avons constaté que la coupure de H (TN = 900 à 1 200 s^{-1}) en αβ est accompagnée d'une diminution d'un facteur 30 de l'activité standard. Nous n'avons pas constaté de modification de"l'affinité apparente" pour le ferricyaure ni du K_m lactate mais ce résultat n'a pas un caractère démonstratif parce que l'échantillon sur lequel ces paramètres cinétiques ont été déterminés pouvait être contaminé par de l'enzyme intact (moins de 5 % non décelés en électrophorèse) qui serait le principal agent catalytique.

Dans l'enzyme homologue de Saccharomyces cerevisiae une coupure apparemment identique donne seulement une perte d'un facteur 2 de l'activité molaire sans changement dramatique des K_m L(+)lactate et ferricyanure (facteur 3) (19).

Il faut noter que le site actif du H-flavocytochrome b_2 est tout à fait remarquable parmi les déshydrogénases ; c'est cette flavodéshydrogénase qui a de beaucoup la plus forte constante de vitesse intramoléculaire pour le transfert substrat fixé ⟶ flavine prosthétique (68). On conçoit que ce site présente des caractères structuraux très précis et qu'il soit particulièrement sensibles à toute modification voisine. Après coupure, l'activité moléculaire de 40 s^{-1} est encore parfaitement honorable.

Il faut retenir cependant que la coupure de la chaine en αβ altère le transfert intramoléculaire d'électrons. Ce résultat est compatible avec l'hypothèse de la flavine fixé entre α et β selon le schéma de la fig. 22.

Nous avons noté que la coupure de α aux loci "c" et "d" donnant ε + η + γ, qui a lieu avec une constante apparente de vitesse de 200.10^{-4} mn^{-1} ne semble pas en elle-même provoquer une chute détectable de l'activité molaire. Comme nous savons qu'après les coupures a, c et d, il se produit une dissociation spontanée de la T-flavoprotéine εβ et de la partie noyau cytochromique η , il est vraisemblable que c'est cette dissociation ou un processus qui la permet (par exemple l'hydrolyse d'un fragment peptidique additionnel aux extrémités d'un des domaines

globulaires) qui est responsable de la chute d'activité. Nous avons vu (voir discussion Chapitre I) que la dégradation β pouvait être corrélée à la perte d'activité de la forme coupée en (αβ).

Après sa dissociation d'avec le noyau cytochromique b_2, la flavoprotéine a une activité enzymatique dans le système L-lactate ferricyanure. Cette activité est faible (TN = 2 sec^{-1}) mais d'autres flavodéshydrogénases ont une activité aussi faible. Citons les cas de l'hydroxynicotinamide oxydase ou la D amino acide oxydase (73). Les K_m de la T-flavoprotéine pour son substrat et son accepteur sont modifiés.

Ici encore, le processus limitant à saturation en ferricyanure est principalement au niveau du transfert lactate fixé-flavine. Cette réaction étudiée au stopped flow (en collaboration avec M. Iwatsubo) s'est montré biphasique : environ 50 % de la flavoprotéine est réduite avec k_{app} = 2,7 s^{-1}, et 50 % avec un k_{app} inférieur d'un facteur 3 suggérant la présence de deux formes moléculaires. Ceci a montré, comme nous l'avons discuté, que l'activité enzymatique trouvée n'est pas un artéfact dû à une contamination par du H-flavocytochrome b_2 actif, mais est bien due à la T-flavoprotéine elle-même. La T-flavoprotéine est donc bien la partie L-lactate flavodéshydrogénase de la molécule de flavocytochome b_2. La forte diminution d'activité molaire entre la forme $(\alpha\beta)_4$ (TN = 70 s^{-1} à 15°C) et la forme supposée être $(\varepsilon\beta)_4$ (TN = 2 s^{-1} à 15°C) suggère que l'hème et/ou l'apo noyau cytochromique b_2 qui lui est attaché dans le H-flavocytochrome b_2 intact jouerait un rôle essentiel soit direct pour le transfert aux accepteurs, soit indirect en activant la flavine. Pour le S-flavocytochrome b_2, la comparaison des chaînes coupées en αβ portant la flavine seule ou la flavine plus l'hème avait semblé indiquer que l'hème ne modifie pas la réactivité de la flavine vis à vis du lactate mais seulement vis à vis des accepteurs comme le ferricyanure (70). En acceptant le premier électron de la flavohydroquinone par un processus rapide intramoléculaire, l'hème oxydé permet le passage d'une espèce peu réactive avec les accepteurs externes à deux formes très réactives : la flavine semiquinone et l'hème réduit (70). Au point de vue fonctionnel le flavocytochrome b_2 intact ou coupé en (αβ) se comporte donc effectivement comme l'association d'une lactate flavodéshydrogénase avec son accepteur spécifique : la partie noyau cytochromique b_2.

Nous avons montré ici qu'au point de vue structural, il en est de même. Le fait que le noyau cytochromique se dissocie spontanément en milieu non dénaturant à neutralité de la partie flavodéshydrogénase dès que les ponts sensibles a, c et d sont coupés indique qu'ils appartiennent effectivement dans la molécule intacte à des domaines globulaires différents. Le flavocytochrome b_2 peut donc désormais être considéré comme formé de deux parties, une partie cytochromique et une partie flavodéshydrogénase biglobulaire, de faible affinité réciproque mais unies par un pont sensible aux protéases.

Cette faible affinité reciproque explique l'utilité que peut avoir eu une fusion de gène qui les a réuni. Cette hypothèse de fusion de gènes, nous allons la discuter dans le paragraphe suivant.

Comparaison des systèmes flavodéshydrogénase-cytochrome b chez la levure et dans les microsomes de foie.

Dans des systèmes autres que celui du flavocytochrome b_2 on retrouve une fonction déshydrogénase associée à une fonction cytochromique b. Dans ces systèmes les deux fonctions sont portées par des molécules différentes.Citons ceux des microsomes du foie, des érythrocytes (58) de la membrane externe des mitochondries du foie (59), de l'appareil de Golgi (60) et de la membrane nucléaire (61).

Parmi ces exemples, nous avons déjà évoqué le système microsomal du cytochrome b_5 couplé à la NADH-cytochrome b_5 réductase, qui est le mieux connu à l'heure actuelle. Nous allons le comparer en détail à celui formé par le flavocytochrome b_2.

L'homologie séquentielle entre le noyau cytochromique b_2 qui comporte sous sa forme "a", 95 résidus,et le noyau cytochromique b_5, qui comporte 93 résidus a été démontrée et discutée par Guiard, Groudinsky et Lederer (38). Les séquences s'alignent sur 90 résidus avec une correspondance ponctuelle, si le résidu N terminal du noyau cytochromique b_2 est placé sous le résidu n°4 du noyau b_5, si on introduit une délétion d'un résidu sur le cytochrome b_2 à l'emplacement de la gly 62 et de un résidu sur le cytochrome b_5 avant l'Ile 75. Pour convaincre le lecteur, nous reproduisons ici les données de Guiard, Groudinsky et Lederer, ainsi que la projection du modèle tridimentionnel du cytochrome b_5, en notant les résidus modifiés dans la poche héminique. En effet, l'homologie séquentielle est en accord avec une conservation très importante de la poche héminique, hydrophobique.

La plupart des structures secondaires du b_5 sont compatibles avec les substitutions du b_2 (fig 24). La similarité des spectres de RMN (Keller, Groudinsky, Wuthrich) indique effectivement une profonde similarité des poches héminiques dans leurs structures tridimentionnelles.

Par contre, les résidus chargés superficiels sont extrêmement modifiés de l'un à l'autre de ces cytochromes.

Une telle homologie ne pourrait s'être formée par évolution convergente qu'avec une probabilité infiniment faible, tandis que, par évolution divergente à partir d'un même gène ancestral, la probabilité devient très grande. Nous retiendrons donc seulement l'hypothèse très probable de l'évolution des deux cytochromes à partir d'un ancêtre commun.

Il était intéressant de voir si la partie flavodéshydrogénase de la molécule de flavocytochrome b_2 peut être homologue de la NADPH flavoréductase associée fonctionnellement au cytochrome b_5, mais constituant une entité moléculaire distincte si l'on en croit les données publiées à ce sujet.

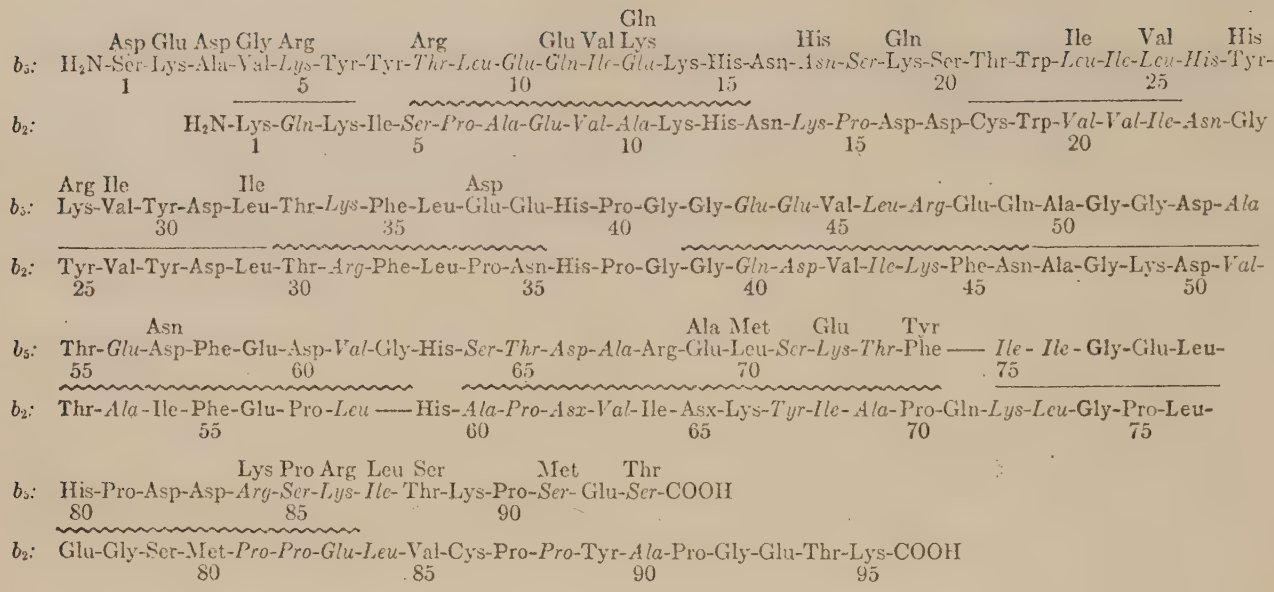
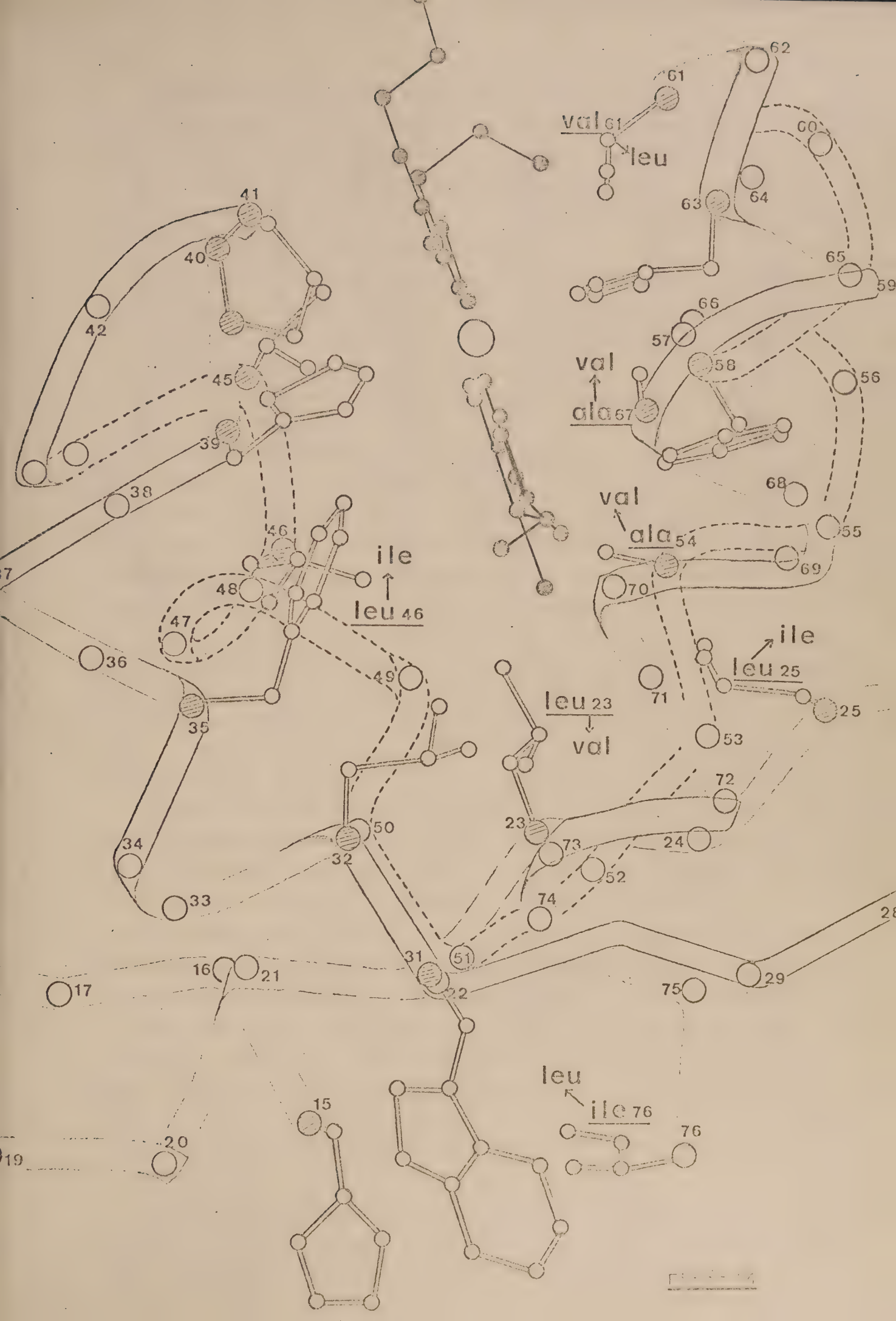


Figure 23 : (ci-dessus) Séquences comparées du cytochrome b_5 des microsomes de foie de veau et du noyau cytochromique b_2 mitochondrial de la levure (d'après Guiard, Groudinsky et Lederer (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 71, 2540).

Figure 24 : (à droite) Comparaison des poches héminiques du cytochrome b_5 et du noyau cytochromique b_2 d'après F. LABEYRIE.

Le squelette représenté est celui de la poche héminique du cytochrome b_5. Les cercles hachurés correspondent aux résidus conservés dans les deux séquences ou résultant de substitutions conservatives. Dans ce dernier cas le résidu vers lequel pointe la flèche est le résidu du noyau cytochromique b_2.


val 61
leu
ile
leu 46
val
ala 67
val
ala 54
ile
leu 25
leu 23
val
leu
ile 76

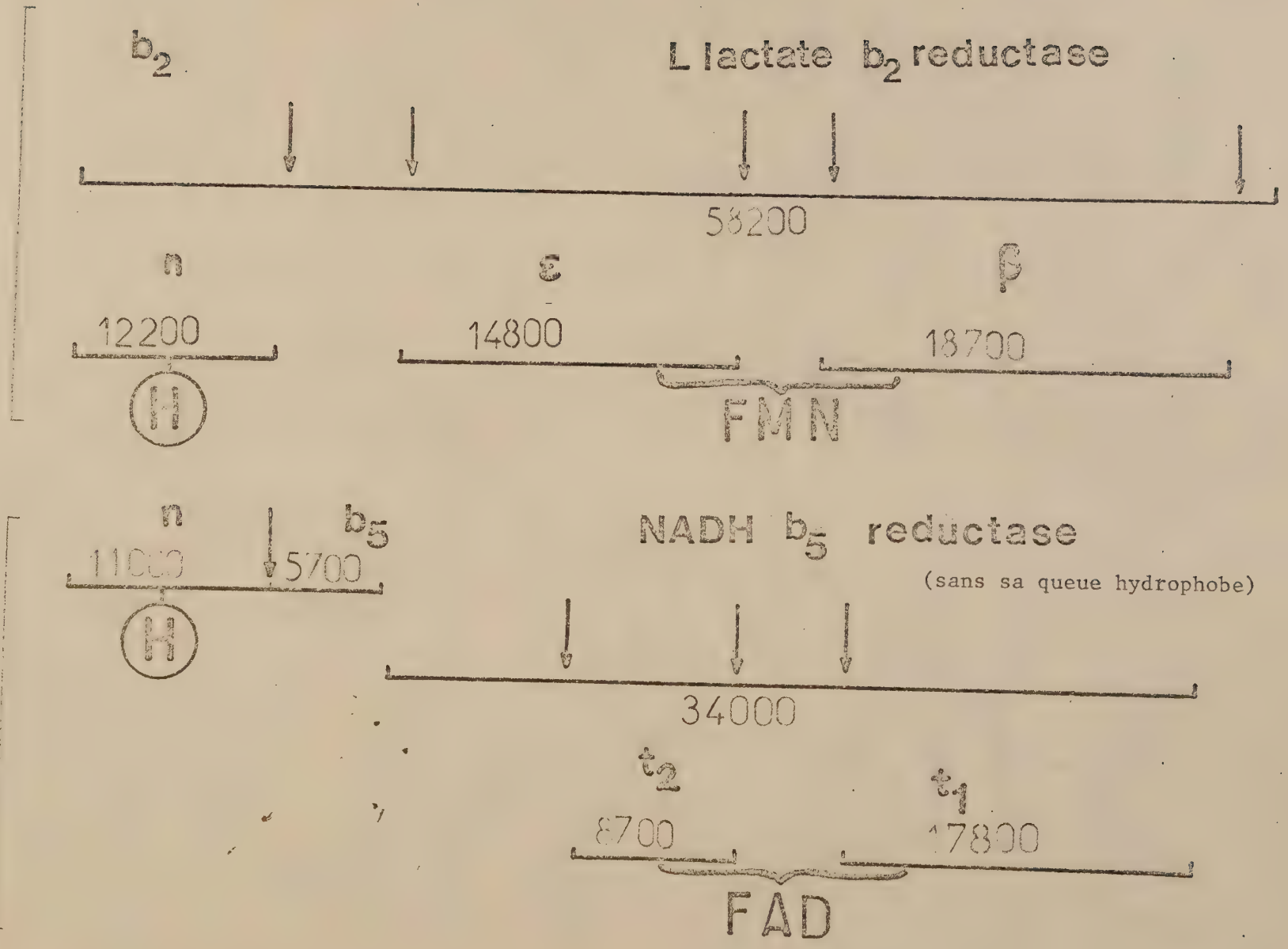


Figure 25 : Comparaison du système mitochondrial de la levure (en haut) et du système microsomal

Strittmatter et coll. ont montré que la NADH cytochrome b_5 réductase microsomale (monomère de 34 000 daltons) pouvait être coupée par la trypsine à forte concentration en deux fragments T_1 (17 800 daltons) et T_2 (8 700 daltons) qui restaient associés en une T-flavoprotéine de 28 400 daltons. Ce dérivé porte le site du substrat (la NADH) et du FAD (62). On peut donc concevoir cette flavodéshydrogénase comme de structure biglobulaire.

Nous trouvons un schéma non identique mais analogue à celui-ci dans le cas du dérivé T flavoprotéique b_2 : deux globules β et ε, fortement associés ayant conservé le site de fixation du FMN et celui du substrat (L-lactate) formant une entité protéique de 33 500 daltons.

La connaissance plus détaillée du système microsomal nous a amené à compléter la comparaison entre les deux systèmes.

Le cytochrome b_5 (11 000 daltons) est en fait un dérivé d'une molécule de 16 700 daltons (63) le cytochrome b_5 extrait par les détergents dont l'hydrolyse, en plus du noyau cytochromique fournit une peptide de 40 résidus très hydrophobe, sujet à la polymérisation (64). Ce peptide très hydrophobe est indispensable à la fixation du cytochrome b_5 à la membrane microsomale (65) il est situé à l'extrémité C terminale de la chaîne.

D'autre part, la NADH b_5 réductase dans sa forme 34 000 est elle même dérivée d'une chaîne plus longue de 43 000 daltons. Le morceau complémentaire que l'on peut séparer de celle-ci par l'hydrolyse chymotrypsique est un fragment hydrophobe de 10 000 daltons qui se polymérise spontanément. Attaché à la protéine, il permet la fixation de celle-ci à la membrane microsomale (66). Sa localisation dans la chaîne N ou C terminale n'est pas connue à l'heure actuelle.

La somme des poids moléculaires du cytochrome b_5 et de la NADH-b_5 réductase extrait par détergents et conservant leurs queues hydrophobes forme un ensemble d'environ 59 000 daltons. Cette valeur est identique -à la précision des mesures près- à celle trouvée pour le monomère du flavocytochrome b_2 (Fig. 25).

Nous sommes amenés,à la suite de la comparaison du système de la levure avec celui du foie,à considérer le locus "c" comme la trace de la soudure des parties flavodéshydrogénase et cytochrome dans le flavocytochrome b_2.

Nous avons placé à gauche,sur le schéma 25 ,le domaine cytochromique b_2 comprenant le noyau cytochromique lui même et un peptide correspondant à la queue hydrophobe décelée dans le cytochrome b_5.Le domaine s'étendant à la droite du point "c" correspondrait à la partie flavodéshydrogénase.Son extrémité N terminale serait constituée,en première approximation,par l'extrémité N terminale de ε .

Pour poursuivre la recherche d'une homologie entre les systèmes de foie et de levure, on peut se demander à quoi correspond le peptide hydrophobe compris dans la NADH flavodéshydrogénase, et séparable par les protéases.

Dans la protéine de levure, nous avons rendu ε responsable des interactions hydrophobes entre protomères. Il est probable que c'est au niveau de ce globule ε que se retrouverait l'homologie de la queue hydrophobe de la cytochrome b_5 réductase.

Dans le flavocytochrome b_2, nous considérons que la meilleure hypothèse concernant la localisation du site flavinique est de le placer dans la crevasse constituée à la jonction des globules ε et β. Dans la NADH flavoréductase le site flavinique du dérivé T flavoprotéique semble lié à l'ensemble des peptides T_1 et T_2.

Dans cette description, nous avons cherché à voir jusqu'où pourrait aller une homologie entre les systèmes de levure et de foie. Nous pouvons conclure du paragraphe précédent que rien dans la comparaison que nous avons faite ne s'oppose à une structure polyglobulaire très homologue.

Cependant, les substrats de ces deux déshydrogénases sont très différents : L(+)lactate d'une part, NADH de l'autre. Selon Rossmann, ce dernier requiert un site de fixation à deux domaines, le domaine nicotinamide et le domaine adénine. Au niveau des coenzymes flaviniques existent d'autres différences : le FMN dans la levure requiert logiquement pour sa fixation un seul domaine globulaire comme dans la flavodoxine. Dans l'enzyme du foie, la flavine est une FAD qui devrait exiger deux domaines pour sa fixation. On s'attendrait donc à une structure beaucoup plus complexe pour l'enzyme du foie que pour celui de la levure.

En absence de données supplémentaires nous conserverons l'hypothèse d'une fusion de gènes ayant eu pour conséquence le regroupement sur une même chaîne des deux fonctions cytochrome et déshydrogénase, une telle fusion ayant permis dans un système non membranaire d'associer de façon intramoléculaire deux éléments n'ayant que peu d'affinité l'un pour l'autre.

Le but de ce travail était d'éclaircir les relations fonction-structure dans le H-flavocytochrome b_2. Nous avons vu que cet enzyme complexe à deux fonctions dépendantes, pouvait être considéré comme l'association d'un flavo-déshydrogénase et de son accepteur spécifique : la partie cytochromique.

Nous avons montré qu'après trypsinolyse les deux domaines structuraux portant chacun son coenzyme et sa fonction propres se séparaient spontanément en milieu non dénaturant.

Nous n'avons pas décrit de façon exhaustive les propriétés de chacun de ces domaines structuraux. Ceci fera l'objet d'une étude ultérieure.

Il serait souhaitable maintenant de réduire à des dimensions encore plus modestes la partie flavoprotéique. Nous pourrons ainsi aborder de façon plus aisée deux types de problèmes : les relations du coenzyme flavinique avec la chaîne polypeptidique et la comparaison avec la cytochrome b_5 réductase.

1 - BACH, S.J., DIXON, M. and ZERFAS, L.G. : Yeast lactic dehydrogenase and cytochrome b_2.
Biochem. J. (1946) 40, 229-239.

2 - BERNHEIM, F. : The separation of the citric acid dehydrase from liver and of the lactic acid dehydrase from yeast.
Biochem. J. (1928) 22, 1178-1192.

3 - APPLEBY, C.A., MORTON, R.K. : Lactic dehydrogenase and cytochrome b_2 of baker's yeast . Purification and crystallization.
Biochem. J. (1959) 71, 492-499.

4 - APPLEBY, C.A. MORTON, R.K. and SIMMONDS, D.H. : Lactic dehydrogenase and cytochrome b_2 of baker's yeast. The amino acid composition of the crystalline enzyme.
Biochem. J. (1960) 75, 72-76.

5 - APPLEBY, C.A. and MORTON, R.K. : Lactic dehydrogenase and cytochrome b_2 of baker's yeast. The deoxyribose polynucleotide component and the physiochemical properties of the crystalline enzyme.
Biochem. J. (1960) 75, 258-268.

6 - ARMSTRONG, J.Mc.D., COATES, J.H. and MORTON, R.K. : Physiochemical studies on cytochrome b_2 : Sedimentation, diffusion and electrophoresis of the crystalline deoxyribonucleoprotein.
Biochem. J. (1963) 86, 136-145.

7 - BOERI, E., CUTOLO, E., LUZZATI, M. and TOSI, L. : Preparation and properties of cytochrome b_2 from yeast.
Arch. Biochem. Biophys. (1955) 56, 487-499.

8 - BOERI, E. and TOSI, L. : Properties of cytochrome b_2 from yeast.
Arch. Biochem. Biophys. (1956) 60, 463-475.

9 - NYGAARD, A.P. : Yeast lactic dehydrogenase : purification and reaction properties.
Biochim. Biophys. Acta (1959) 33, 517-521.

10 - APPLEBY, C.A., and MORTON, R.K. :Lactic dehydrogenase and cytochrome b_2 of baker's yeast enzymic and chemical properties of the crystalline enzyme.
Biochem. J. (1959) 73, 539-550.

11 - SOMLO, M.: La L-lacticodéshydrogénase de la levure aérobie. Comparaison des propriétés de l'enzyme lié et de l'enzyme soluble.
Biochim. Biophys. Acta (1962) 65, 333-346.

12 - SLONIMSKI, P. : La formation des enzymes respiratoires chez la levure.
Masson, Paris (1953).

13 - SOMLO, M. : Induction des lactico cytochrome c oxydoréductase (D. et L) de la levure aérobie par les lactates (D et L).
Biochim. Biophys. Acta (1965) 97, 183-201.

14 - PAJOT, P. and CLAISSE, M.L. : Utilization by yeast of D-lactate and L-lactate as sources of energy in the presence of antimycin A.
Eur. J. Biochem. (1974) 49, 275-285.

15 - CAPEILLERE-BLANDIN, C., BRAY, R.C., IWATSUBO, M. and LABEYRIE F. : Flavocytochrome b_2 : Kinetic studies by absorbance and electron paramagnetic resonance spectroscopy of electron distribution among prosthetic groups.
Eur. J. Biochem. (1975) 54, 549-566.

16 - CAPEILLERE-BLANDIN, C. : Flavocytochrome b_2 : Simulation studies of the electron transfer reactions among the prosthetic groups.
Eur. J. Biochem. (1975) 56, 91-101

17 - MONTEILHET, C. and RISLER, J.L. : Molecular weight and quaternary structure of yeast L-lactate dehydrogenase (cytochrome b_2) : X ray diffraction studies.
Eur. J. Biochem. (1970) 12, 165-169.

18 - MEVEL-NINIO, M. : Subunit structure of L-lactate dehydrogenase (cytochrome b_2) of Saccharomyces cerevisiae : ultracentrifugation studies.
Eur. J. Biochem. (1972) 25, 254-261.

19 - JACQ, C. et LEDERER, F. : Sur les deux formes moléculaires du cytochrome b_2 de Saccharomyces cerevisiae.
Eur. J. Biochem. (1971) 25, 41-48.

20 - JACQ, C. and LEDERER, F. : Molecular weight and quaternary structure of yeast L-lactate dehydrogenase (cytochrome b_2) : minimum molecular weight from amino acid analyses.
Eur. J. Biochem. (1970) 12, 154-157.

21 - PAJOT, P. and GROUDINSKY, O. : Molecular weight and quaternary structure of yeast L-lactate dehydrogenase (cytochrome b_2). II : Revised heme extinction coefficients and minimal molecular weight.
Eur. J. Biochem. (1970) 12, 158-164.

22 - LEDERER, F. and SIMON, A.M. : Subunits of baker's yeast cytochrome b_2 (L-lactate cytochrome c oxidoreductase). I - Separation, molecular weight and amino acid analysis.
Eur. J. Biochem. (1971) 20, 469-474.

23 - SPYRIDAKIS, A., NASLIN, L. and LABEYRIE, F. : Baker's yeast crystalline cytochrome b_2 : improved preparation and electrophoresis studies of subunit constitution.
Biochimie (Paris) (1971) 53, 195-205.

24 - JACQ, C. : Thèse de Doctorat ès Sciences, Orsay (1974).

25 - NASLIN, L., SPYRIDAKIS, A. and LABEYRIE, F. : A study of several bonds hypersensitive to proteases in a complex flavohemoenzyme : yeast cytochrome b_2.
Eur. J. Biochem. (1973) 34, 268-283.

26 - PORTER, : The hydrolysis of rabbit γ globulin and antibodies with crystallin papain.
Biochem. J. (1959) 73, 119-126

27 - GOLDBERG, M.E. : Tertiary structure of Escherichia Coli β D-galactosidase.
J. Mol. Biol. (1969) 46, 441-446.

28 - KLENOW, H. and HENNINGSENI, I. : Proteolytic cleavage of DNA polymerase from E.coli B into an exonuclease unit and a polymerase unit. Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett. (1970) 6, 25-30.

29 - KLENOW, H., OVERGAARD-HANSEN, K. and PATKAR, S.A. : Proteolytic cleavage of native DNA polymerase into two different catalytic fragments. Eur. J. Biochem. (1971) 22, 371-381.

30 - EVENTOFF, W. and ROSSMAN, M.G. : The evolution of dehydrogenases and kinases. C.R.C. Critical Review in Biochemistry (1975) 3, 111-140.

31 - MEVEL-NINIO, M., RISLER, Y. and LABEYRIE, F. : Structural studies of yeast flavocytochrome b_2. Respective roles of the α and β globules in the formation of heme and flavin binding site. (en préparation).

32 - LABEYRIE, F., GROUDINSKY, O., JACQUOT-ARMAND, Y. et NASLIN, L. : Propriétés d'un noyau cytochromique b_2 résultant d'une protéolyse de la L-lactate cytochrome c oxydoreductase de la levure. Biochim. Biophys. Acta (1966) 128, 492-503.

33 - GUIARD, B., LEDERER, F. and JACQ, C. : More similarity between baker's yeast L(+)lactate dehydrogenase and liver microsomal cytochrome b_5. Nature (London) (1975) 255, 442-443.

34 - GROUDINSKY, O. : Caracterisation de la liaison hème-protéine du cytochrome b_2 de la levure par l'étude des propriétés physicochimiques du noyau cytochromique b_2. Thèse de Doctorat ès Sciences, Paris (1972).

35 - WATARI, H., GROUDINSKY, O. and LABEYRIE, F. : Electron spin resonance of cytochrome b_2 and cytochrome b_2 core. Biochim. Biophys. Acta (1967) 131, 592-594.

36 - KELLER, R.M., GROUDINSKY, O. and WUTHRICH, K. : Proton magnetic resonances in cytochrome b_2 core. Structural similarities with cytochrome b_5. Biochim. Biophys. Acta (1973) 328, 233-238.

37 - KELLER, R.M., GROUDINSKY, O. and WUTHRICH, K. : Contact shiffed resonances in the ^1H NMR spectra of cytochrome b_5 : resonance identification and spin density distribution in the heme group. Biochim. Biophys. Acta (1976) (soumis pour publication).

38 - GUIARD, B., GROUDINSKY, O. and LEDERER, F. : Homology between baker's yeast cytochrome b_2 and liver microsomal cytochrome b_5. Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1974) 71, 2539-2543.

39 - GUIARD, B. : Séquence de la fraction hemoprotéique du cytochrome b_2 de la levure (Saccharomyces cerevisiae). Homologies avec le cytochrome b_5. Thèse de 3ème cycle , Orsay (1973).

40 - SHAPIRO, A.L., VINUELA, E. and MAIZEL, R. : Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS polyacrylamide gels. Biochem. Biophys. Res. Comm. (1967) 28, 815-820.

41 - WEBER, K. and OSBORN, M. : The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. (1969) 244, 4406-4412.

42 - NASLIN, L., Communication personnelle.

43 - BAUDRAS, A. : Pure L-lactate : cytochrome c oxidoreductase of the yeast Hansenula anomala offers new prospect for the study of intramolecular multi electrons transfer.
Biochimie (Paris) (1971) 53, 929-933.

44 - BAUDRAS, A. et SPYRIDAKIS, A., : Etude de la L(+)lactate cytochrome c oxydoreductase (cytochrome b_2) de la levure Hansenula anomala. I Preparation et caracterisation de l'enzyme pure.
Biochimie (Paris) (1971) 53, 943-955.

45 - LASKOWSKI, M., Methods Enzymol. (1955) 2, 32-

46 - HUMMEL, B.C.W., Can. J. Biochem. Physiol. (1959) 37, 1393

47 - MORTON, R.K. and STURTEVANT, J.M. : Kinetic investigations of yeast L-lactate dehydrogenase.
J. Biol. Chem. (1964) 239, 1614-1624.

48 - IWATSUBO, M. et DI FRANCO, A. : Groupes prosthetiques de la L-LDH ; III Etude fluorométrique de la cinétique et de l'équilibre de combinaison du FMN à la partie protéique.
Bull. Soc. Chim. Biol. (1965) 47, 891-910.

49 - MEVEL-NINIO, M., PAJOT, P. et LABEYRIE, F. ; Reconstitution of cytochrome b_2 following prosthetic groups dissociation by guanidine hydrochloride, protoheme binding.
Biochimie (Paris) (1971) 53, 35-41.

50 - PAJOT, P. : Fluorescence of proteins in 6 M guanidine hydrochloride. A method for the quantitative determination of tryptophan.
Eur. J. Biochem. (1976) 63, 263-269.

51 - BAUDRAS, A., CAPEILLERE-BLANDIN, C., IWATSUBO, M. and LABEYRIE, F. ; "Structure and Function of Oxidation-reduction enzymes" ed. by Akeson,A. and Ehrenberg, A., Pergamon Press, Oxford (1972) 273-290.

52 - GUGGENHEIM, E.A. : On the determination of the velocity constant of a unimolecular reaction.
Phil. Mag. (1926) 1, 538-543.

53 - CAPEILLERE-BLANDIN, C. : Caracterisation des transferts d'électrons au sein du flavocytochrome b_2.
Thèse de Doctorat ès Sciences, Orsay (1974).

54 - GUIARD, B. and LEDERER, F. : Baker's yeast flavocytochrome b_2 (L(+)lactate dehydrogenase) : an immunological study of structure and function.
Eur. J. Biochem. (1976) accepté pour publication.

55 - OUCHTERLONY, O. , Acta Pathol. Microbiol. Scand. (1949) 39, 46-52.

56 - PRINGLE, J.R. : The molecular weight of the undegraded polypeptide chain of yeast hexokinase.
Biochem. Biophys. Res. Comm. (1970) 39, 46-52.

57 - GUIARD, B., Communication Personnelle.

58 - PASSON, P.G. and HULTQUIST, D.E. : Soluble cytochrome b_5 reductase from human erythrocytes.
Biochim. Biophys. Acta, (1972) 275, 62-73.

59 - SOTTOCASA, G.L., KUYLENSTIERNA, B., ERNSTER, L. and BERGSTRAND, A. : An electron transport system associated with the outer membrane of liver mitochondria : a biological and morphological study.
J. Cell. Biol. (1967) 32, 415-438.

60 - ICHIKAWA, Y. and YAMANO, T. : Cytochrome b_5 and cobinding cytochromes in the golgi membranes of mammalian livers.
Biochem. Biophys. Res. Comm. (1970) 40, 297-305.

61 - BEREZNEY, R. and CRANE, F.L. : Characterization of electron transport activity in bovine liver nuclear membranes.
J. Biol. Chem. (1972) 247, 5562-5568.

62 - STRITTMATTER, P., BARRY, R.E. and CORCORAN, D. :Tryptic conversion of cytochrome b_5 reductase to an active derivative containing two peptide chains.
J. Biol. Chem. (1972) 247, 2768-2775.

63 - ITO, A. and SATO, R. : Purification by means of detergents and properties of cytochrome b_5 from liver microsomes.
J. Biol. Chem. (1968) 243, 4922-4923.

64 - SPATZ, L. and STRITTMATTER, P. : A form of cytochrome b_5 that contains an additional hydrophobic sequence of 40 amino acid residues.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA. (1971) 68, 1042-1046.

65 - STRITTMATTER, P., ROGERS, M.J. and SPATZ, L. : The binding of cytochrome b_5 to liver microsomes.
J. Mol. Chem. (1972) 247, 7188-7194.

66 - SPATZ, L. and STRITTMATTER, P. : A form of reduced nicotinamide adenine dinucleotide cytochrome b_5 reductase containing both the catalytic site and an additional hydrophobic membrane binding segment.
J. Biol. Chem. (1973) 248, 793-799.

67 - Pharmacia Fine Chemicals (1967) Sephadex : Théorie et pratique de la filtration sur gel.

68 - LABEYRIE, F. : Communication Personnelle.

69 - POMPON, D. : Résultats non publiés.

70 - NINIO, M., IWATSUBO, M. and LABEYRIE, F. : Rapid kinetics studies of partial reactions in the heme free derivative of L-lactate cytochrome c oxidoreductase (flavocytochrome b_2) : the flavodehydrogenase function.
Biochemistry (1976) soumis pour publication.

71 - MULET, C. : Marquage d'affinité sur le cytochrome b_2.
Thèse de 3ème cycle, Orsay (1976).

72 - LEDERER, F. : On the first steps of lactate oxidation by bakers'yeast L(+)lactate dehydrogenase (cytochrome b_2).
Eur. J. Biochem. (1974) 46, 393-399.

73 - MASSEY, V., MULLER, F., FELDBERG, R., SCHUMAN, M., SULLIVAN, P.A., HOWELL, L.G. MAYHEW, S.G., MATTHEWS,R.G. and FOUST, G.P. : The reactivity of flavoproteins with sulfite.
J. Biol. Chem. (1969) 244, 3999-4006.